Série A, Orsay
N° d'ordre : 79

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS
CENTRE D'ORSAY

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Jacques DURANTON

1re **THÈSE** — ÉTUDE DE LA BIOGENÈSE ET DE LA CONSTITUTION DES CHLOROPLASTES A L'AIDE DES INDICATEURS RADIOACTIFS

2e **THÈSE** — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Soutenues le 19 FEV. 1965, devant la Commission d'examen

MM. CHOUARD ..... *Président*
MOYSE ..... *Examinateurs*
LAVOREL .....

PARIS
GAUTHIER-VILLARS, Editeur
55, quai des Grands-Augustins
1965

Série A, Orsay
N° d'ordre : 79

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS
CENTRE D'ORSAY

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Jacques DURANTON

1re **THÈSE** — ÉTUDE DE LA BIOGENÈSE ET DE LA CONSTITUTION DES CHLOROPLASTES A L'AIDE DES INDICATEURS RADIOACTIFS

2e **THÈSE** — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Soutenues le 19 FEV. 1965 , devant la Commission d'examen

MM. CHOUARD ..... *Président*
MOYSE ..... } *Examinateurs*
LAVOREL ..... }

PARIS
GAUTHIER-VILLARS, Editeur
55, quai des Grands-Augustins
1965

Faculté des Sciences de l'Université de Paris

Doyen ..... M. Zamansky

PROFESSEURS

Julia G.	T	Analyse supérieure et Algèbre supérieure.
Prenant	T	Anatomie et Histologie comparées.
Grassé	T	Evolution des êtres organisés.
Prévost	T	Chimie organique.
Wyart	T	Minéralogie et Cristallographie.
Teissier	T	Zoologie.
Mangenot	T	Biologie végétale (Orsay).
Auger	T	Physique quantique et Relativité.
Monnier	T	Physiologie générale.
Piveteau	T	Paléontologie.
Rocard	T	Physique (E.N.S.).
Cartan	T	Mathématiques (E.N.S.).
Laffitte	T	Chimie générale.
Favard	T	Géométrie supérieure.
Coulomb	T	Physique du globe.
Mlle Cousin	T	Biologie animale (S.P.C.N.).
Chrétien	T	Chimie minérale.
Drach	T	Zoologie.
Kastler	T	Physique (E.N.S.).
Ephrussi	T	Génétique.
Rivière	T	Géologie (S.P.C.N.) et Sédimentologie.
Gautheret	T	Biologie végétale (P.C.B.).
Lucas R.	T	Recherches physiques.
Thomas A.	T	Biologie cellulaire.
Arnulf	T	Optique appliquée.
Morand	T	Physique Enseignement.
Soleillet	T	Physique (P.C.B.).
Fortier	T	Mécanique expérimentale des fluides.
Danjon	T	Astronomie.
Petit	T	Biologie maritime.
Queney	T	Météorologie et Dynamique atmosphérique.
Gallien	T	Embryologie.
Eichhorn	T	Botanique.
De Cugnac	T	Biologie végétale (S.P.C.N.).
Mlle Cauchois	T	Chimie physique.
Thellier	T	Physique du globe.
L'Héritier	T	Biologie générale (Orsay).
Grivet	T	Radioélectricité (Orsay).
Poncin	T	Mécanique générale.
Dubreil	T	Arithmétique et Théorie des nombres.
Quelet	T	Chimie organique.
Cagniard	T	Géophysique appliquée.
Champetier	T	Chimie macromoléculaire.
Cuvillier	T	Micropaléontologie.
Jung	T	Pétrographie.
Trillat	T	Microscopie et Diffraction électronique.
Wiemann	T	Chimie organique et structurale.
Jacquinot	T	Spectroscopie et Physique céleste (Orsay).
Vassy	T	Physique de l'atmosphère.
Destouches	T	Théories physiques.
Amiel	T	Chimie générale.
Hocart	T	Minéralogie et Cristallographie.
Mathieu J.P.	T	Physique optique.
Couteaux	T	Biologie animale (P.C.B.).
May	T	Zoologie (Orsay).
Choquet	T	Théorie des fonctions et Topologie.
Feldmann	T	Biologie végétale marine.
Guinier	T	Physique des solides (Orsay).
Jost	T	Physiologie comparée.
Fortet	T	Calcul des probabilités et Physique mathématique.
Schwartz	T	Calcul différentiel et intégral.
Chouard	T	Physiologie végétale.
Malavard	T	Aviation (Technique aéronautique).
Brelot	T	Calcul différentiel et intégral.
Normant	T	Chimie organique.
Benard	T	Chimie minérale.
Buvat	T	Botanique (E.N.S.).
Dugué	T	Statistiques mathématiques.
Soulairac	T	Psychophysiologie.
Ulrich	T	Physiologie végétale.
Maréchal	T	Optique théorique et appliquée.
Kirrmann	T	Théories chimiques.
Chadefaud	T	Botanique.
Mlle Le Breton	T	Physiologie de la nutrition.
Salem	T	Mathématiques générales.
Lelong	T	Application de l'Analyse à la Géométrie.
Devillers	T	Anatomie et Histologie comparées.
Ehresmann	T	Topologie algébrique.
Françon	T	Physique (S.P.C.N.).
Glangeaud	T	Géographie physique et Géologie dynamique.
Godement	T	Mathématiques (M.P.C.).
Pisot	T	Techniques mathématiques de la Physique.
Roch	T	Géologie.
Schatzman	T	Astrophysique.
Termier	T	Paléontologie stratigraphique.
Zamansky	T	Mathématiques générales.
Lennuier	T	Physique (M.G.P.).
Rizet	T	Génétique.
Routhier	T	Géologie appliquée.
Mme Tonnelat	T	Physique théorique.
Dixmier	T	Mathématiques (M.P.C.).
Souchay	T	Chimie générale.
Aigrain	T	Electrotechnique générale.
Brusset	T	Chimie systématique.
Lévy M.	T	Physique théorique des hautes énergies (Orsay).
Mme Chaix	T	Chimie biologique.
Mme Hurel-Py	T	Biologie végétale (P.C.B.).
Piaux	T	Chimie (M.P.C.).
Brun	T	Mécanique théorique des fluides.
Lederer	T	Chimie biologique.
Mme Dubreil	T	Mathématiques (Agrégation).
Mme Lelong	T	Mathématiques II (E.N.S.).
Bellair	T	Géologie (S.P.C.N.).
Cotte	T	Physique Électricité.
Dubois J.E.	T	Chimie organique.
Lamotte	T	Zoologie (E.N.S.).
Michel A.	T	Chimie minérale (Orsay).
Olmer	T	Energétique générale.
Rouault	T	Electricité (Orsay).
Gauthier	T	Mécanique appliquée.
Barchewitz	T	Chimie physique.
Brossel	T	Physique atomique.
Buser	T	Physiologie comparée.
Camus	T	Physiologie végétale (B.M.P.V.).
Castaing	T	Physique II Thermodynamique (Orsay).
Curien	T	Minéralogie et Cristallographie.
Moyse	T	Physiologie végétale (Orsay).
Noirot	T	Evolution des êtres organisés.
Pannetier	T	Chimie générale.
Possompes	T	Zoologie.
Pullmann	T	Chimie quantique.
Teillac	T	Physique nucléaire et Radioactivité.
Tonnelat	T	Biologie physico-chimique.
Ville	T	Econométrie.
Willemart	T	Chimie (P.C.B.).
Dode	T	Chimie (Orsay).
Freymann	T	Recherches physiques.

Guinochet	T	Biologie végétale (S.P.C.N. Orsay).
Rollet	T	Chimie minérale.
Mlle Josien	T	Chimie (S.P.C.N.).
Chevalley	T	Géométrie algébrique et Théorie des groupes.
Arnoult	T	Electronique (Orsay).
Chapelle	T	Physique (Orsay).
Delange	T	Mathématiques I (Orsay).
Deny	T	Mathématiques générales (Orsay).
Germain	T	Mécanique théorique des fluides.
Lucas G.	T	Géologie.
Allard	T	Chimie physique.
Berthelot	T	Physique des particules fondamentales.
Bricart	T	Météorologie et Physique de l'atmosphère.
Mme Albe-Fessard	T	Psychophysiologie.
Friedel	T	Physique des solides (Orsay).
Julia M.	T	Etudes des moléculaires naturelles complexes.
Lender	T	Biologie animale (S.P.C.N. Orsay).
Magat	T	Physico-chimie des radio-éléments.
Mlle Quintin	T	Electrochimie.
Monod	T	Chimie du métabolisme.
Benoit	T	Physiologie animale (Orsay).
De Possel	T	Analyse numérique.
Charlot	T	Chimie analytique.
Lemée	T	Physiologie végétale (B.M.P.V. Orsay).
Guérin	T	Chimie (M.P.C. Orsay).
Chatelet M.	T	Chimie (P.C.B.).
Jean	T	Physique nucléaire (Orsay).
Mattler	T	Physique (S.P.C.N.).
Bergerard	T	Zoologie (Orsay).
Bertein	T	Electronique (Orsay).
Bouissières	T	Chimie des radioéléments (Orsay).
Mme Couture	T	Thermodynamique et Mécanique physique.
Ellenberger	T	Géologie des grandes régions du globe.
Franc	T	Biologie animale (P.C.B.).
Schnell	T	Botanique tropicale (Orsay).
Stolkowski	T	Physiologie générale.
Acher	T	Chimie biologique.
Baudoin		Biologie animale (P.C.B.).
Beaumont		Biologie animale (S.P.C.N.).
Blamont	T	Géophysique de l'ionosphère.
Bourreau		Botanique.
Curie D.		Physique (M.G.P.).
Durand-Delga	T	Géologie.
Freon	T	Chimie organique (Orsay).
Heller	T	Physiologie végétale.
Tortrat	T	Calcul des probabilités.
Cailleux		Géologie (S.P.C.N.).
Magnan	T	Physique (S.P.C.N.).
Daudel	T	Mécanique ondulatoire appliquée à la Chimie théorique et à la Physique nucléaire.
Mlle Fourcroy		Biologie végétale (S.P.C.N.).
Mme Choquet-Bruhat	T	Mécanique analytique et Mécanique céleste.
Mlle Weil		Physiologie générale.
Lwoff	T	Microbiologie.
Siestrunck	T	Mécanique physique et expérimentale.
Lacombe	T	Métallurgie des métaux nucléaires.
Brochard	T	Physique (P.C.B. Orsay).
Cabannes	T	Mécanique générale.
Lesieur	T	Mathématiques I (Orsay).
Mazet	T	Mécanique générale (Orsay).
Caire		Géographie physique et Géologie dynamique.
Comolet	T	Mécanique des fluides.
Corabœuf	T	Physiologie animale (Orsay).
Delloue		Physique de l'exosphère.
Gorenflot		Botanique II (Orsay).
Houillon		Biologie animale (P.C.B.).
Jullien J.	T	Chimie (S.P.C.N. Orsay).
Malgrange	T	Techniques mathématiques de la Physique (Orsay).
Olivier		Anthropologie.
Nozeran	T	Botanique II (Orsay).
Blanc-Lapierre	T	Physique (E.N.S. Orsay).
Chevaugeon	T	Botanique (Orsay).
Kahane	T	Mathématiques (Orsay).
Samuel	T	Mathématiques (E.N.S. féminine).
Kourganoff	T	Astronomie (Orsay).
Thiry	T	Mécanique céleste.
Abeles		Physique (S.P.C.N.).
Amat		Physique (P.C.B.).
Auboin		Géologie.
Mme Benoit-Gueutal		Physique nucléaire et Radioactivité (Orsay).
Bougis		Biologie marine (Villefranche-sur-Mer).
Bruhat	T	Mathématiques (M.P.C.).
Brunn	T	Géologie historique (Orsay).
Chabbal		Physique (M.G.P. Orsay).
Deheuvels	T	Mathématiques propédeutiques. (Orsay).
D'Espagnat		Physique théorique (Orsay).
Furon		Géologie (S.P.C.N.).
Mme Gans	T	Génétique.
Geneves		Biologie végétale (P.C.B.).
Guilbert		Physique (C.U.S. Orléans).
Hupe		Pétrographie.
Hollande	T	Biologie générale.
Lions	T	Analyse numérique.
Maitte		Chimie (P.C.B.).
Meyer		Physique propédeutique.
Nicolas		Géologie appliquée.
Panigel		Biologie générale.
Ravier		Pétrographie.
Roseau	T	Mécanique théorique des fluides.
Roubine		Electronique.
Silber	T	Chimie (P.C.B.).
Uebersfeld	T	Electronique.
Yvon	T	Théories physiques.

Secrétaire général ..... R. Poullain

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544306_0022

Physiol. Vég., 1964, **2** (4), 363-408.

Étude de la biogenèse et de la constitution des chloroplastes à l'aide des indicateurs radioactifs

Jacques DURANTON

Service de Biophysique, Département de Biologie, Commissariat à l'Energie Atomique, Saclay (S.-et-O.), France

(Manuscrit reçu le 6 octobre 1964)

RÉSUMÉ

L'étude de la structure des chloroplastes est effectuée en suivant deux voies différentes d'investigation ; l'une étudie l'action des détergents, l'autre les modifications biochimiques qui apparaissent au cours du verdissement. L'emploi d'indicateurs radioactifs comme le ^{32}P, le ^{35}S et le ^{14}C précise l'analyse biochimique.

Avec le dodécylsulfate de sodium (détergent anionique) la dispersion des chloroplastes de *Nicotiana tabacum* L, variété Samsum, est obtenue sans rupture des liaisons entre les protéines, les pigments et les phospholipides. Les nucléotides et les acides nucléiques sont détachés du complexe chromo-protéique. Le dodécylsulfate de sodium utilisé à différentes concentrations permet une séparation de deux complexes absorbant l'un à 680 mμ, l'autre à 670 mμ et dont la composition chimique est différente. Avec le Tween 20 (détergent non ionique) il est observé non seulement une rupture des liaisons entre les pigments et les protéines, mais également une séparation des phospholipides et des protéines. Par électrophorèse, il est possible d'obtenir les protéines seules.

La teneur en protéines et l'incorporation de composés marqués tels que, $^{35}SO_4^{--}$, cystéine ^{35}S, glycocolle ^{14}C, acide δ-amino-lévulique ^{14}C, lysine ^{14}C, hydrolysat de protéines ^{14}C de Chlorelles, ont été étudiés au cours du verdissement de plantules de *Zea Mays* L, variété INRA 260. Si la lumière provoque une synthèse importante de chlorophylle, elle ne détermine pas un accroissement des protéines totales des plastes. Les proplastes possèdent l'N protéique nécessaire à l'édification des lamelles et granums qui forment la structure caractéristique des chloroplastes.

Les analyses montrent également que les proplastes possèdent des quantités d'ARN semblables à celles des chloroplastes et les précurseurs des noyaux tétrapyrroliques nécessaires à la synthèse de la chlorophylle.

Les proplastes, comme les chloroplastes sont capables d'effectuer *in vitro* la synthèse de protéines.

SUMMARY

The study of the structure of chloroplasts is carried out along two different lines of investigation. One studies the action of detergents; the other, the biochemical modifications which appear during greening. The use of radioactive indicators such as ^{32}P, ^{35}S *and* ^{14}C *ensures accurate biochemical analysis.*

With sodium dodecylsulfate (anionic detergent) the dispersion of the chloroplasts of Nicotiana tabacum *L., variety Samsum, is obtained without rupture of the linkages between the proteins, pigments and phospholipids. The nucleotids and nucleic acids are detached from the chromoproteic complex. Sodium dodecylsulfate used in different*

concentrations allows separation of two complexes, one being absorbed at 680 mμ *the other at* 670 mμ, *of different chemical composition. With Tween* 20 *(non-ionic detergent) not only is a rupture of the pigment and protein linkages observed, but also a separation of the phospholipids and the proteins. By electrophoresis, it is possible to obtain the proteins alone.*

The protein content and the incorporation of labeled compounds such as $^{35}SO_4^{--}$, *cysteine* ^{35}S, *glycine* ^{14}C, *δ-amino-levulic* ^{14}C *acid, lysine* ^{14}C, *and a hydrolysate of proteins* ^{14}C *of Chlorella, have been studied during greening of plantlets of* Zea Mays *L., variety INRA* 260. *If light causes major chlorophyll synthesis, it does not bring about any increase in the total proteins of the plasts. The proplasts possess the proteic N necessary to the building up of the lamellae and the granums which form the characteristic structure of the chloroplasts.*

The analyses also show that proplasts possess quantities of RNA similar to those of chloroplasts, and the precursors of the tetrapyrrolic ring necessary to the synthesis of chlorophyll.

Proplasts, like chloroplasts, are capable of protein synthesis in vitro.

INTRODUCTION

Seule la connaissance de l'état dans lequel se trouvent les pigments, dans les organismes photosynthétiques, permettra de comprendre la nature de leur participation dans les réactions de la photosynthèse. Il est donc nécessaire de connaître, dans les chloroplastes, les liaisons qui existent entre la chlorophylle et les différentes molécules qui l'entourent, ainsi que leur arrangement.

De nombreuses recherches ont été effectuées pour atteindre ce but, avec l'aide des énormes progrès faits dans le domaine de la technique. La microscopie électronique a permis une étude de la structure des proplastes et des plastes. Les résultats obtenus par LEYON (1954), STEINMANN et SJÖSTRAND (1955), Von WETTSTEIN (1958), HODGE (1959), SAGER et PALADE (1957) ont permis d'établir la structure lamellaire des plastes et une corrélation entre cette structure et la capacité photosynthétique. Grâce aux études de Von WETTSTEIN (1958), VIRGIN, KAHN et Von WETTSTEIN (1962), on a pu comprendre également comment se formait cette structure avec l'apparition des pigments nécessaires à la photosynthèse. Les observations microscopiques, en liaison avec les données fournies par l'analyse biochimique des plastes, ont permis d'élaborer des schémas comme ceux d'HUBERT (1936), d'HODGE, McLEAN et MERCER (1955) et de WOLKEN (1958), qui tendent à donner une idée de l'arrangement des molécules constitutives des plastes.

Ces observations, cependant, n'ont pas fourni une information définitive ni sur cet arrangement ni sur les liaisons qui existent entre les différentes molécules.

Abréviations

ADN	:	Acide désoxyribonucléique.
ADP	:	5′ Diphosphate d'Adénosine.
AMP	:	5′ Monophosphate d'Adénosine.
ARN	:	Acide ribonucléique.
ATP	:	5′ Triphosphate d'Adénosine.
GSH	:	Glutathion réduit.
GTP	:	5′ Triphosphate de Guanine.
i.p.m.	:	Impulsions par minute.
mCi	:	Millicurie.
SDS	:	Dodécylsulfate de sodium.

Les techniques spectroscopiques, de leur côté, amènent à conclure que la chlorophylle ou la bactériochlorophylle, se présentent dans les organismes vivants sous différentes formes qui correspondent sans doute à des liaisons et des arrangements différents entre les pigments, les protéines et les lipides. Ces formes se révèlent par des modifications dans les spectres d'absorption des pigments *in vivo* et en particulier dans la position des pics d'absorption dans le rouge. Les travaux de KRASNOVSKY, VOROB'EVA et PAKASHINA (1957), SHIBATA (1957), BROWN et FRENCH (1959), THOMAS (1962) montrent l'existence de différentes formes de chlorophylles, sans les relier à une activité biologique spécifique. Mais les nombreuses recherches de DUYSENS (1961), de WITT, MÜLLER et RUMBERG (1962) montrent l'intervention de deux systèmes photochimiques dans la photosynthèse et permettent de déceler *in vivo* deux formes de chlorophylle *a* bien distinctes. Des efforts ont été faits pour séparer les holochromes que laissent entrevoir les études spectroscopiques. Si SMITH et COOMBER (1961) ont pu isoler le protochlorophylle holochrome et étudier ses propriétés, on n'a pu jusqu'ici obtenir que des séparations partielles des autres catégories d'holochromes. Les séparations ont été effectuées soit à l'aide de détergents (BRIL, 1958, 1960) soit à l'aide de la centrifugation dans un gradient de densité (ALLEN, MURCHIO, JEFFREY et BENDIX, 1963 ; BROWN, 1962). Par ailleurs, des préparations de chlorophylle *in vitro*, ayant des spectres d'absorption correspondant grossièrement à celui de la chlorophylle *in vivo*, ont été obtenues. Les propriétés physiques et photochimiques de plusieurs états colloïdaux de la chlorophylle *a* ont été passées en revue par BANNISTER (1963).

Le problème de l'arrangement des molécules au sein des plastes a été abordé également par des études sur le dichroïsme. Si ces études ont pu un instant faire penser que les molécules de chlorophylle étaient orientées, les récents travaux de SAUER et CALVIN (1962), d'OLSON, BUTLER et JENNINGS (1961, 1962) semblent montrer qu'en fait seulement 5 % de celles-ci le seraient.

Dans le présent travail, on a essayé d'obtenir une connaissance de l'arrangement et des liaisons entre les différents éléments constitutifs des chloroplastes, de deux manières différentes.

La première utilise les détergents. Grâce à ces composés organiques, différents auteurs ont pu obtenir une solubilisation ou mieux une dispersion du matériel chloroplastique en milieu aqueux. Au cours d'un tel processus, quelles sont les liaisons rompues ? En variant la nature du détergent utilisé, on peut espérer obtenir la rupture entre la chlorophylle et d'autres constituants des plastes, entre les phospholipides et les protéines, etc. et en mieux connaître par suite l'agencement.

La seconde manière consiste à étudier, au cours du verdissement de plantules étiolées soumises à la lumière, les modifications biochimiques qui accompagnent la transformation des proplastes jaunes en chloroplastes. Que se passe-t-il lorsque la chlorophylle apparaît ? Comment s'intercale-t-elle entre les autres composés lorsque naît la structure lamellaire et granaire des chloroplastes ? On peut peut-être alors observer si la chlorophylle est la dernière molécule qui manquait à l'édifice ou si d'autres substances nécessaires étaient également absentes. L'ordre dans lequel de telles substances apparaîtraient pourrait donner vraisemblablement des indications sur leurs liaisons respectives et leur arrangement.

ACTION DES DÉTERGENTS SUR LES CHLOROPLASTES

Les détergents comprennent des composés anioniques, cationiques et non ioniques.

L'action d'un composé anionique, le dodécylsulfate de sodium (SDS) et celle d'un composé non ionique, le Tween 20, ont été étudiées.

ACTION DU DODÉCYLSULFATE DE SODIUM

C'est à SMITH (1941*a*, *b*, *c*,), SMITH et PICKELS (1941), que revient le mérite d'avoir les premiers réussi à solubiliser le matériel chloroplastique en utilisant soit la digitonine et les sels biliaires, soit le dodécylsulfate de sodium (SDS). Ils ont ainsi pu mettre en évidence l'existence d'une liaison entre les différents pigments des chloroplastes et les protéines. Ils ont montré également que les liaisons protéines-pigments ne sont pas rompues par l'action du SDS, alors que la digitonine ou les sels biliaires les rompent.

Cependant, la solubilisation du matériel chloroplastique par le SDS n'intéresse pas seulement les protéines et les pigments chlorophylliens et caroténoïdes, mais aussi les phospholipides, les nucléotides et les acides nucléiques. Dans le présent travail, on a cherché à déterminer de façon aussi complète que possible le mode d'action du SDS lors de la solubilisation et la nature des différents produits qui prennent naissance.

Matériel et méthodes

Les expériences sont effectuées avec des chloroplastes isolés de feuilles adultes prélevées sur des *Nicotiana tabacum* L (variété Samsum) de même âge (5 mois). Les tabacs sont cultivés en serre sur terreau.

Le ^{32}P a été utilisé comme indicateur pour marquer les différents composés phosphorylés et ainsi faciliter l'analyse biochimique et l'étude de l'action du SDS sur le complexe pigmentaire. L'indicateur est fourni aux feuilles, détachées de la tige, en plaçant leur pétiole dans un petit tube contenant 4 à 5 gouttes de solution radioactive de $HNa_2\,^{32}PO_4$ sans entraîneur. La solution aqueuse est à pH 7, stérile et a une radioactivité de 2 mCi/ml. La quantité de phosphore qu'elle renferme est extrêmement faible, inférieure au μg/ml. Après 30 mn d'incorporation de ^{32}P, les feuilles sont placées sur des solutions de Knop (MILLER, 1938) non radioactives jusqu'à ce que les prélèvements soient effectués. Chaque prélèvement comprend 3 feuilles adultes, l'ensemble pesant de 15 à 20 g.

Séparation des chloroplastes et extraction du complexe pigmenté

Les chloroplastes sont obtenus par broyage au mortier, avec du sable fin, d'environ 15 à 20 g de feuilles dans 200 ml de tampon phosphate 0,25 M, pH 7,8, à 4 °C. Le broyat est filtré sur étamine afin d'éliminer le sable et les grosses particules et le filtrat est centrifugé à 200 g pendant 1 à 2 mn. Le surnageant est ensuite soumis pendant 20 mn à 1 000 g. Le culot obtenu, qui contient les chloroplastes et des grains d'amidon, est mis en suspension dans le même tampon et centrifugé à nouveau pendant 20 mn à 1 000 g. L'opération est effectuée ainsi trois fois, de manière à laver les

chloroplastes afin qu'ils ne soient pas contaminés par des substances provenant du cytoplasme ou d'autres éléments figurés (l'examen microscopique confirme que mitochondries et noyaux ont pratiquement été écartés). Au cours des lavages, des protéines solubles des plastes s'échappent (Arnon, 1961 ; Heber et Tyskiewicz, 1962), ce qui importe peu puisque l'on est intéressé à l'ensemble lié aux pigments.

Le culot de chloroplastes est ensuite traité par du SDS dans du tampon phosphate 0,02 M, pH 7, 8 de telle sorte que la solution finale soit à 0,2 % de SDS pour une teneur en chlorophylle d'environ 200 μg/ml. Après centrifugation à 20 000 g pendant une heure, on obtient un culot blanc et un surnageant vert et limpide qui correspond au complexe pigmenté. Une analyse du culot blanc de centrifugation n'y a pas révélé la présence notable d'azote ou de lipides. Ce culot est principalement composé d'amidon.

Précipitation fractionnée du complexe

Le complexe chromoprotéique est précipité par du sulfate d'ammonium de concentrations croissantes. Les différents précipités obtenus sont comparés entre eux et à la solution initiale. La précipitation est effectuée à 4 °C le jour même de l'obtention, sur une solution de complexe contenant 200 μg de chlorophylle par ml. Dans les expériences, les concentrations en sulfate d'ammonium utilisées sont de 5, 10, 15 et parfois 20 %.

Pour chaque concentration en sulfate d'ammonium, le complexe est laissé 30 mn à précipiter. On centrifuge ensuite à 30 000 g pendant 15 mn, afin de séparer le précipité obtenu avant de passer à une concentration supérieure. Les différents précipités sont redissous dans du tampon phosphate 0,01 M.

Electrophorèse sur papier

La solution initiale de complexe et les différentes fractions obtenues par précipitation au sulfate d'ammonium sont soumises à l'électrophorèse, comme l'indiquent Bacon et Clendenning (1956). On opère à 4 °C avec une solution de SDS à 0,2 % dans du tampon borate 0,1 M, pH 8,9. Le complexe est déposé sur papier Whatman n° 3. Son déplacement s'effectue vers l'anode. Il est très rapide : 28 mm sous 5 V/cm pendant 70 mn.

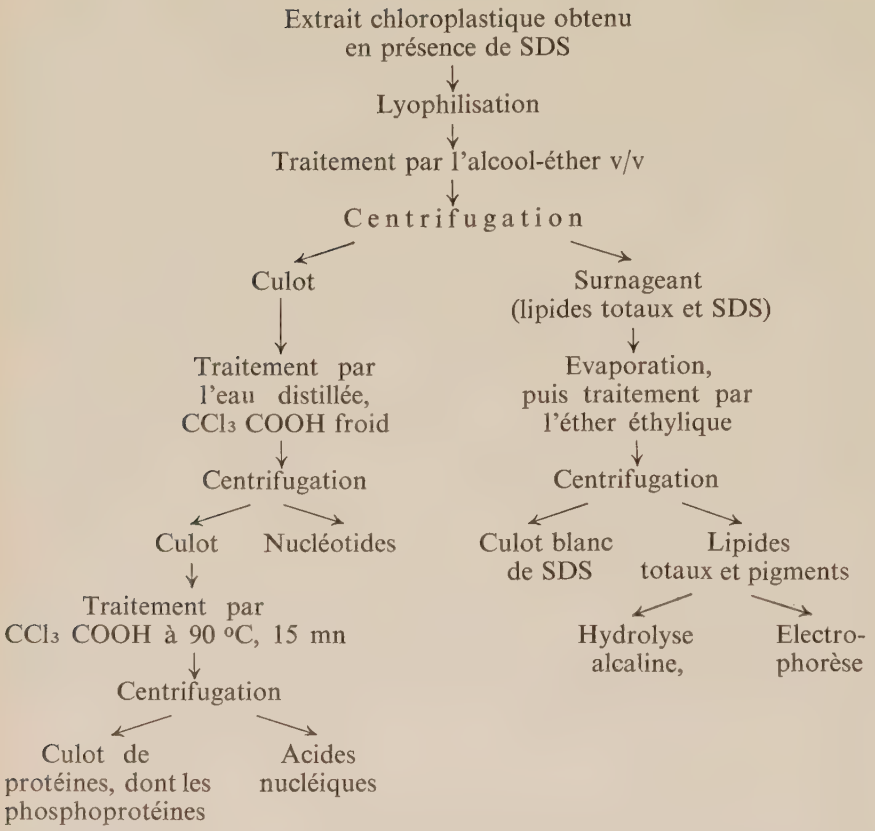
Techniques d'analyse

Les techniques utilisées pour l'analyse biochimique du complexe sont résumées dans le schéma de la page 368.

Extraction et analyse des phospholipides

L'extraction des phospholipides s'opère à froid par le mélange alcool-éther (1 : 1 v/v) sur le lyophilisat. Après trois extractions successives, il ne reste plus de phospholipides. Un traitement ultérieur par le méthanol bouillant ou par le benzène s'avère inutile. Après évaporation sous vide et à froid des solutions éthéro-alcooliques, le résidu sec est repris par l'éther éthylique seul. La centrifugation sépare une fraction blanche insoluble dans l'éther mais soluble dans l'alcool éthylique pur. Le dosage du SDS par la rosaniline, selon la méthode de Karush et Sonenberg (1950) montre que cette fraction contient tout le SDS du lyophilisat.

Les lipides totaux, qui sont en solution dans l'éther éthylique, sont soumis à



l'électrophorèse sur papier suivant la méthode de KANNGIESSER utilisée par SAITO et AKASKI (1957) :

solvant : acide acétique glacial, chloroforme, pyridine (1 : 1 : 1 : v/v, pH 7).

La séparation des phospholipides en trois groupes principaux (acides phosphatidiques, céphalines, lécithines) est effectuée après 12 h d'électrophorèse dans un champ de 28 V/cm.

Les papiers d'électrophorèse sont révélés par les réactifs indiqués par SAITO et AKASKI. Avec l'acide phosphomolybdique, il est possible de localiser des traces de lécithines (8 μg), des bases organiques libres telles que la choline (6 μg) et la triméthylamine (10 μg).

L'extrait lipidique brut est également soumis à l'hydrolyse alcaline suivant la technique de DAWSON (1954). Dans ce but, il est amené à sec à température ordinaire. Le résidu est repris par du tétrachlorure de carbone auquel sont ajoutés du méthanol et de l'eau (6,3 ml de méthanol, 0,9 ml d'eau, pour 0,8 ml de tétrachlorure de carbone). Le mélange est traité avec 2 ml de méthanol contenant de la soude à la concentration 1 M. L'hydrolyse a lieu pendant 15 mn à 37 °C. La fraction soluble dans l'eau est neutralisée par passage sur résine Amberlite IRC 50 et ensuite chromatographiée dans les solvants suivants, préconisés par BENSON et MARUO (1958) :

1) Phénol saturé d'eau ;
2) Butanol, acide propionique, eau (100/50/70, v/v).

Le tableau I donne les R_F des substances separées à l'aide des solvants ci-dessous.

TABLEAU I

R_F des produits obtenus par hydrolyse alcaline des phospholipides

Composés	Phénol saturé d'eau	Butanol Acide propionique Eau
Glycérylphosphorylcholine	0,89	0,29
Glycérylphosphorylglycérol	0,4	0,17
Diglycérylphosphorylglycérol	0,14 0,30	0,07 0,07
Glycérylphosphorylinositol	0,12	0,05
Glycérylphosphorylsérine	0,22	0,12
Glycérylphosphoryléthanolamine	0,65	0,23

L'identification des différentes taches observées sur les chromatogrammes est effectuée après élution du papier. La glycérylphosphorylsérine (GPS) et la glycérylphosphorylcholine (GPC) sont identifiées après hydrolyse acide selon la méthode de LEVINE et CHARGAFF (1951). En l'absence de témoins, les R_F voisins de la glycérylphosphorylsérine et du diglycérylphosphorylglycérol (GPGPG) déjà observés par BENSON et STRICKLAND (1960) peuvent faire hésiter entre ces deux substances. L'hydrolyse acide permet de les distinguer. La GPS a en effet une vitesse d'hydrolyse plus lente que le GPGPG et elle libère de la sérine au cours de la réaction. L'hydrolysat de la glycérylphosphorylsérine isolée, s'il contient principalement de la sérine, a montré aussi, par chromatographie, d'autres taches de bien moindre importance, révélables par la ninhydrine. L'identification du glycérylphosphorylglycérol est effectuée également selon les techniques de BENSON et STRICKLAND (1960).

TRAITEMENT DE L'INSOLUBLE A L'ÉTHER-ALCOOL

Le complexe lyophilisé ayant été soumis à l'action du mélange éther-alcool (v/v), il reste un résidu blanc qui comprend des nucléotides, des acides nucléiques et des protéines. Ce résidu est repris par l'eau distillée puis l'acide trichloracétique à 5 %, d'abord à froid et enfin à chaud selon la technique de SCHNEIDER (1945). Les extraits réunis forment la fraction nucléotides-acides nucléiques.

Après élimination de l'acide trichloracétique par l'éther éthylique et dessiccation, les extraits sont déposés sur papier Whatman n° 1 et chromatographiés dans les deux dimensions avec les solvants ci-dessous :

1) Acide isobutyrique, Eau, NH_4OH, 66/33/15, v/v
2) n propanol, NH_4OH, Eau 60/30/10, v/v

Les taches sont observées sous ultra-violets, en plongeant ou non les feuilles de papier dans l'air liquide. La révélation s'effectue par pulvérisation du réactif suivant :

Acide perchlorique à 60 %	5 ml
Molybdate d'ammonium à 4 %	25 ml
HCl N	10 ml
Eau	60 ml

L'orthophosphate se révèle immédiatement en jaune. Les taches de phosphore organique apparaissent en laissant sécher le chromatogramme plusieurs heures à l'obscurité. L'exposition du papier aux ultra-violets peut compléter la révélation.

Techniques relatives aux substances radioactives

Ainsi qu'il a été décrit précédemment, le ^{32}P est livré sous forme d'une solution aqueuse de $HNa_2{}^{32}PO_4$ neutre et stérile.

Révélation des taches radioactives sur les bandes d'électrophorèse ou sur les chromatogrammes

L'autoradiographie utilise des films Kodirex dont l'émulsion est mise en contact avec les bandes d'électrophorèse ou les chromatogrammes. L'ensemble est pressé entre deux plaques de contreplaqué afin d'établir un contact étroit. Le temps d'exposition est variable. Pour 10 i.p.m. par cm^2, les chromatogrammes doivent rester en contact environ 1 mois avec le film.

Mesure de la radioactivité des substances

Après localisation des taches radioactives par autoradiographie, les substances repérées sont éluées, soit directement dans les coupelles de comptage si les radioactivités présentes sont faibles, soit dans des fioles graduées d'où l'on prélève une partie aliquote. Les mesures de la radioactivité sont faites en couche très mince, ce qui permet de négliger la perte des particules β, due à l'auto-absorption. Les quantités de matières déposées sur les coupelles d'aluminium de 4,5 cm^2 sont généralement de l'ordre de quelques μg. Rarement elles atteignent le mg.

Pour obtenir l'uniformité de la surface du dépôt, les coupelles subissent un traitement préliminaire qui assure la bonne répartition, mieux que l'addition d'une goutte de substance tensio-active. Les coupelles sont d'abord dégraissées par de l'éther-alcool, puis placées ensuite dans de l'eau que l'on porte à ébullition. On ajoute alors du carbonate de sodium (environ 10 g/l), cesse le chauffage et agite pendant 10 à 15 mn. Les coupelles sont ensuite lavées à l'eau jusqu'à neutralité, puis séchées.

L'équipement de comptage C.E.A. est utilisé pour la mesure de la radioactivité des échantillons. Le ^{32}P émettant des β^- de forte énergie, pratiquement toutes les particules β traversent les fenêtres des compteurs qui ont une masse inférieure à 3 mg/cm^2.

Résultats

Pour faciliter l'étude de l'action du SDS sur le complexe pigmentaire, ce dernier est marqué en donnant à des feuilles adultes du $HNa_2{}^{32}PO_4$ sans entraîneur. La répartition de la radioactivité dans les feuilles au cours de la journée est étudiée. Des lots de 3 feuilles adultes sont constitués. L'incorporation du ^{32}P dure 30 mn, puis les lots sont placés sur des solutions non radioactives jusqu'à ce que les prélèvements soient effectués. Pendant toute l'expérience, l'éclairement est de 10 000 lux et la température reste entre 20 et 25 °C. L'ensemble des feuilles de chaque lot a incorporé environ 6×10^7 i.p.m. Le Tableau II indique comment se répartit le ^{32}P dans des feuilles mises en présence de $HNa_2{}^{32}PO_4$ de 7 h 30 mn à 8 h et prélevées ensuite toutes les 2 h.

TABLEAU II

Répartition du ^{32}P en pour cent de la radioactivité totale prise par les feuilles

Séparation des constituants par broyage et centrifugation en milieu aqueux. Activité totale pour chaque prélèvement : 6×10^7 i.p.m.

Heure du prélèvement	Surnageant	Complexe pigmentaire	Amidon
10 h	97,6	1,7	0,7
12 h	94	2,4	3,6
14 h	90	3,1	6,9
16 h	87	3,8	9,2
18 h	81	5	14

Le complexe pigmentaire qui est étudié ne renferme que 2 à 5 % du ^{32}P incorporé. Tous les constituants des chloroplastes, à l'exception des grains d'amidon, sont mis en solution en milieu aqueux, grâce au SDS, comme il a été indiqué précédemment.

Précipitation par le sulfate d'ammonium

L'extrait au SDS comprend l'ensemble des pigments chlorophylliens et caroténoïdes, les protéines, les phospholipides et les acides nucléiques. Il est traité par $(NH_4)_2SO_4$. Une concentration de :

5 % en $(NH_4)_2SO_4$ entraîne la précipitation de 48 % du complexe
10 % » » » 25 % »
15 % » » » 18 % »

Total ..... 91 %

Si les chloroplastes ont été marqués par du ^{32}P, la radioactivité retrouvée dans chacune des fractions, ramenée au μg de chlorophylle, est toujours la même. Après précipitation complète du complexe, on constate qu'il reste dans la solution de 20 à 30 % du ^{32}P. La radioactivité restante est due à des composés organiques qui ne sont pas liés au complexe chromoprotéique, ainsi qu'il sera décrit plus loin.

Electrophorèse sur papier

Lorsque l'extrait total au SDS et les différents précipités obtenus par l'action du $(NH_4)_2SO_4$ sont soumis à l'électrophorèse, on constate que l'ensemble des pigments émigre avec les protéines vers l'anode. Les protéines et les pigments restent liés. Pour chacun des précipités étudiés, comme pour l'extrait total, la révélation des protéines par l'amido-black (BIER, 1959) ne décèle qu'une seule tache. La radioactivité des différents précipités se retrouve à l'emplacement des protéines et des pigments.

Avec l'extrait total, si la majeure partie de la radioactivité est également avec les protéines et les pigments, on distingue cependant une deuxième tache radioactive qui s'en détache (fig. 1).

L'électrophorèse dans les mêmes conditions, en l'absence de SDS dans la solution tampon, ne provoque pas de migration du ou des complexes pigmentaires

(fig. 2). Là encore, pour les précipités à 5, 10 et 15 % de sulfate d'ammonium, on trouve une seule tache radioactive située à l'emplacement des protéines et des pigments. Pour l'extrait total, il existe d'autres taches radioactives où l'on ne peut déceler la présence de protéines.

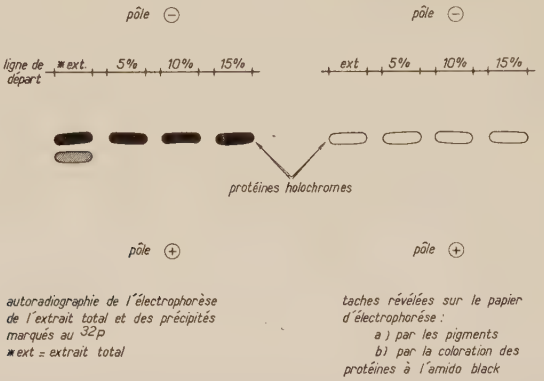


FIG. 1. — Schéma de l'électrophorèse de l'extrait total au SDS et des fractions précipitées à 5 %, 10 % et 15 % de $(NH_4)_2SO_4$. Solution d'électrophorèse : SDS à 0,2 % dans du tampon borate 0,1 M, pH 8,9, température 4 °C, tension 5 V/cm, durée 2 h 30.

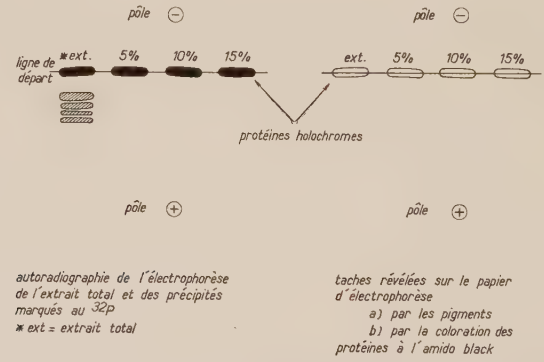


FIG. 2. — Schéma de l'électrophorèse de l'extrait total au SDS et des fractions précipitées à 5 %, 10 % et 15 % de $(NH_4)_2SO_4$. Solution d'électrophorèse : tampon borate 0,1 M, pH 8,9, température : 4 °C, tension : 5 V/cm, durée 2 h 30.

L'extrait pigmentaire ne se déplaçant, au cours de l'électrophorèse, que lorsque le SDS est présent dans le tampon, sa mobilité semble due davantage à un entraînement par le SDS qu'aux charges des protéines. Ainsi s'expliquerait la mobilité identique des différents précipités et de l'extrait total.

Après lyophilisation, les précipités et l'extrait total peuvent être solubilisés à nouveau dans le tampon phosphate. L'électrophorèse de telles solutions, par la méthode de BACON et CLENDENNING (1956), montre que des caroténoïdes restent sur la ligne de départ tandis que protéines et chlorophylles se déplacent ensemble dans le champ électrique. Il n'a pas été vérifié si la totalité des caroténoïdes est détachée. Cependant ce résultat indique qu'au cours de la lyophilisation il y a rupture, au moins partielle, des liaisons entre les caroténoïdes et le complexe pigmentaire.

Analyse biochimique de l'extrait total et des fractions précipitées par le $(NH_4)_2SO_4$

Le tableau III indique les résultats obtenus lorsque le prélèvement est effectué 5 h après le retrait des feuilles de la solution radioactive.

TABLEAU III

Répartition de la radioactivité dans les différents précipités

Résultats exprimés en pour cent de la radioactivité totale de chaque fraction. Radioactivité absorbée par 3 feuilles (20 g de substance fraîche) : 6×10^7 i.p.m. Radioactivité de l'extrait total : 210 i.p.m. par µg de chlorophylle. Radioactivité des différents précipités : 175 i.p.m. par µg de chlorophylle.

Fractions analysées	Phospholipides	Nucléotides et Acides nucléiques	Phospho-protéines
Extrait total	44	34	22
Complexe précipité par 5 % $(NH_4)_2SO_4$	60	15	25
Complexe précipité par 10 % $(NH_4)_2SO_4$	62	14	24
Complexe précipité par 15 % $(NH_4)_2SO_4$	62	14	24

Lorsque l'extrait au SDS est précipité par le $(NH_4)_2SO_4$ en différentes fractions, celles-ci se révèlent identiques quant à la répartition du ^{32}P. Les différences concernant l'extrait total sont dues aux 20 % de radioactivité supplémentaire de la fraction nucléotides et acides nucléiques. Ces 20 % sont retrouvés dans la solution lorsque la totalité du complexe est précipitée par le sulfate d'ammonium. Ils se retrouvent également à l'électrophorèse, séparés des protéines holochromes.

L'identité des différentes fractions se constate également dans la répartition de la radioactivité entre les différents phospholipides des précipités à 5, 10 ou 15 % de sulfate d'ammonium, comme on le verra plus loin.

Non seulement le SDS ne rompt pas les liaisons entre protéines et pigments mais il ne brise pas non plus les liaisons des phospholipides avec ces mêmes substances. Ces liaisons paraissent plus fortes qu'on ne le supposait jusqu'ici. Bien que les phospholipides soient solubles dans une solution de SDS à 0,2 %, on peut penser que les différents pigments (chlorophylles, caroténoïdes) gênent l'action du SDS sur les liaisons protéines-phospholipides, d'autant plus que les pigments sont insolubles dans la solution aqueuse de SDS utilisée. Par comparaison, on a fait agir le SDS, à la concentration finale de 0,2 %, sur une préparation de sérum de Rat renfermant une quantité de phospholipides correspondant à 45 µg de phosphore par ml de sérum. A un volume donné de sérum, on ajoute le même volume de SDS à 0,4%. Le liquide obtenu est limpide. Après une heure, les protéines sont précipitées par l'acide trichloracétique à la concentration de 10 %. Alors que les phospholipides libres restent dans ces conditions en solution en présence de SDS, les phospholipides liés aux protéines accompagnent ces dernières dans le précipité obtenu. On peut cependant ensuite les extraire par action de l'éther et de l'alcool. On retrouve avec les protéines la totalité du phosphore des phospholipides du sérum. Le SDS ne rompt donc pas les liaisons entre phospholipides et protéines.

Le SDS n'agit que sur les liaisons concernant les acides nucléiques. Ce fait est en accord avec les expériences montrant la rupture par le SDS des liaisons entre

acides nucléiques et protéines des nucléoprotéines, ainsi que l'a signalé PIRIE (1938) à propos du virus de la Mosaïque du Tabac.

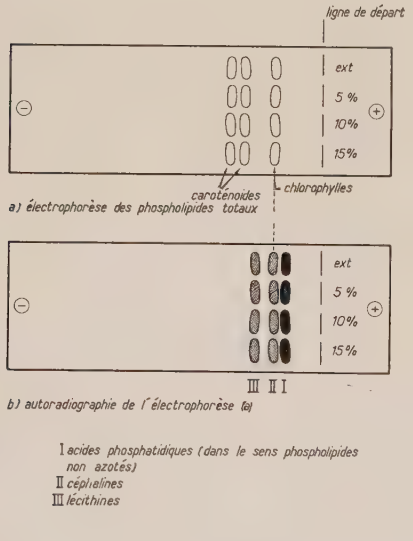
ANALYSE DES PHOSPHOLIPIDES DES DIFFÉRENTES FRACTIONS

La figure 3 illustre la séparation par électrophorèse des principaux groupes de phospholipides (acides phosphatidiques, céphalines, lécithines) présents dans les différentes fractions.

L'autoradiographie montre que les acides phosphatidiques sont de beaucoup les plus radioactifs. Les lécithines et les céphalines le sont peu. La chlorophylle se déplace toujours avec les céphalines alors que les caroténoïdes donnent deux bandes en avant des lécithines.

La répartition de la radioactivité entre les trois groupes de phospholipides est la même pour les différentes fractions, qu'il s'agisse de l'extrait total ou des précipités par le $(NH_4)_2SO_4$.

Les différents phospholipides peuvent être séparés après hydrolyse alcaline (DAWSON, 1954) et chromatographie des produits d'hydrolyse qui sont solubles dans l'eau (BENSON et MARUO, 1958). La figure 4 représente les autoradiographies des chromatogrammes.



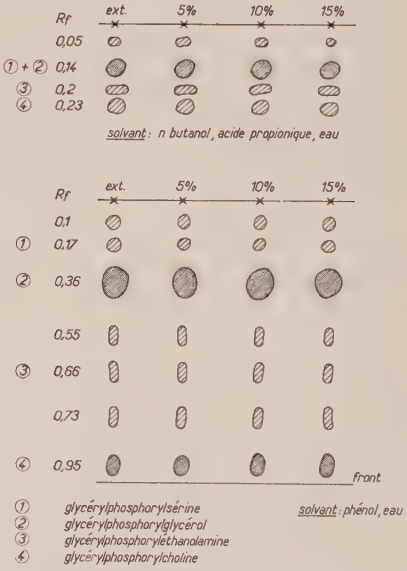


FIG. 3. — Schéma de l'électrophorèse des phospholipides totaux.
Feuilles 30 mn sur ^{32}P puis sur solution nutritive. Prélèvement 5 h après passage sur ^{32}P. Solvant : acide acétique glacial, chloroforme, pyridine, 1/1/1, v/v, pH 7, tension 28 V/cm, temps : 12 h.

FIG. 4. — Schéma des chromatogrammes des produits solubles dans l'eau obtenus par hydrolyse alcaline des phospholipides. Révélation des produits marqués au ^{32}P par autoradiographie.

La majeure partie du ^{32}P se retrouve dans le glycérylphosphorylglycérol (GPG). Quelle que soit la fraction analysée, la répartition des taches et l'intensité de la radioactivité est la même (voir également les tableaux IV et VI). Ce fait est une preuve supplémentaire que les phospholipides liés n'ont pas été détachés de l'ensemble protéines-pigments.

Afin de préciser si les conditions du milieu auxquelles sont soumises les plantes interviennent dans la répartition du ^{32}P entre les différents groupes de substances du complexe pigmentaire, les expériences suivantes sont réalisées. Des feuilles sont prélevées sur des pieds de Tabac de même âge ayant passé soit 48 h en lumière continue soit 60 h à l'obscurité. Puis elles reçoivent le $^{32}PO_4^{3-}$.

La répartition de la radioactivité dans les phospholipides, pour les feuilles prélevées sur des plantes éclairées antérieurement pendant 48 h, est donnée dans le tableau IV.

TABLEAU IV

Répartition du ^{32}P dans les differents phospholipides

Résultats exprimés en pour cent de la radioactivité totale des phospholipides de chaque précipité. Feuilles prélevées sur des pieds soumis à la lumière continue pendant 48 h avant l'expérience.

Fractions analysées	Glycéryl-phosphoryl-sérine	Glycéryl-phosphoryl-glycérol	Glycéryl-phosphoryl-choline
Extrait total	23	40	16
Complexe précipité par 5 % $(NH_4)_2SO_4$	22	39	17
Complexe précipité par 10 % $(NH_4)_2SO_4$	24	41	16
Complexe précipité par 15 % $(NH_4)_2SO_4$	27	39	15

La répartition du ^{32}P dans les différents groupes de substances analysées est fournie par le tableau V.

TABLEAU V

Répartition du ^{32}P dans les différents groupes de substances analysées

Résultats exprimés en pour cent de la radioactivité totale des précipités. Radioactivité de l'extrait total : 210 i.p.m. par µg de chlorophylle. Radioactivité des différents précipités : 175 i.p.m. par µg de chlorophylle. Feuilles prélevées sur des pieds soumis à la lumière continue pendant 48 h avant l'expérience.

Fractions analysées	Phospholipides	Nucléotides - Acides nucléiques	Phospho-protéines
Extrait total	50	32	18
Complexe précipité par 5 % $(NH_4)_2SO_4$	60	15	25
Complexe précipité par 10 % $(NH_4)_2SO_4$	60	17	23
Complexe précipité par 15 % $(NH_4)_2SO_4$	63	17	20

Les résultats de l'analyse de feuilles prélevées sur des pieds de Tabac placés pendant 60 h à l'obscurité, avant l'expérience, sont donnés dans le tableau VI.

TABLEAU VI

Répartition du ^{32}P dans les différents phospholipides

Résultats exprimés en pour cent de la radioactivité totale des phospholipides de chaque précipité. Feuilles prélevées sur des pieds soumis à l'obscurité pendant 60 h avant l'expérience.

Fractions analysées	Glycéryl-phosphoryl-sérine	Glycéryl-phosphoryl-glycérol	Glycéryl-phosphoryl-choline
Extrait total	10	74	6,5
Complexe précipité par 5 % $(NH_4)_2SO_4$	13	70	7
Complexe précipité par 10 % $(NH_4)_2SO_4$	10	73	6,7
Complexe précipité par 15 % $(NH_4)_2SO_4$	12	71	6,6

La répartition du ^{32}P dans les différents groupes de substances analysées est indiquée dans le tableau VII.

TABLEAU VII

Répartition du ^{32}P dans les différents groupes de substances analysées

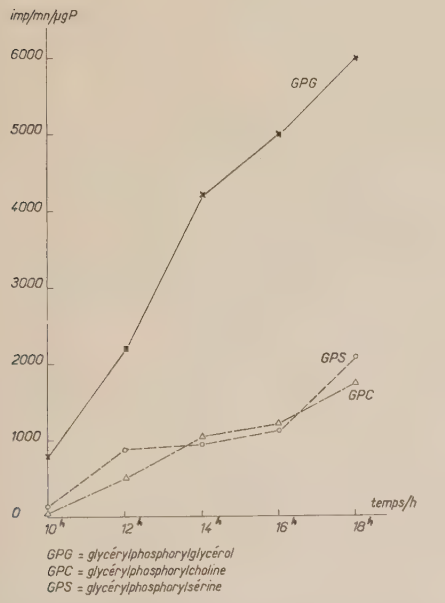
Résultats exprimés en pour cent de la radioactivité totale des précipités. Radioactivité de l'extrait total : 210 i.p.m. par µg de chlorophylle. Radioactivité des différents précipités : 175 i.p.m. par µg de chlorophylle. Feuilles prélevées sur des pieds soumis à l'obscurité pendant 60 h avant l'expérience.

Fractions analysées	Phospholipides	Nucléotides - Acides nucléiques	Phospho-protéines
Extrait total	53	25	22
Complexe précipité par 5 % $(NH_4)_2SO_4$	71	5	24
Complexe précipité par 10 % $(NH_4)_2SO_4$	74	2	24
Complexe précipité par 15 % $(NH_4)_2SO_4$	72	3	25

La constance du marquage relatif des phospholipides, dans les différents précipités, montre que ces substances font partie du complexe isolé par l'action du SDS. Les analyses montrent aussi une intégration du ^{32}P, dans les divers composés phosphorylés du complexe pigmentaire, différente suivant l'état physiologique des feuilles. Le marquage est plus important dans les phospholidides lorsque les feuilles proviennent de plantes laissées à l'obscurité. Il est relativement moins élevé pour les feuilles

des plantes soumises à un long éclairement. Dans le premier cas, au marquage supérieur des phospholipides par rapport aux autres constituants, correspond par contre une faible radioactivité de la fraction nucléotides et acides nucléiques. Une différence encore plus accentuée s'observe dans la répartition de la radioactivité entre les différents phospholipides. Sous l'action de la lumière, les radioactivités de la glycéryl-phosphorylsérine et de la glycérylphosphorylcholine sont plus élevées et celle du glycérylphosphorylglycérol l'est moins qu'après l'obscurité.

Les radioactivités spécifiques du glycérylphosphorylglycérol (GPG), de la glycérylphosphorylsérine (GPS) et de la glycérylphosphorylcholine (GPC) ont été mesurées à différents moments de la journée sur des feuilles dont les pétioles ont été immergés pendant 30 mn dans une solution de $^{32}PO_4^{3-}$ puis placés dans une solution non radioactive. Les variations des radioactivités spécifiques au cours de la journée sont indiquées dans la figure 5. Le GPG a une radioactivité spécifique toujours supérieure à celles de la GPS et de la GPC. Ces deux dernières substances ont des radioactivités spécifiques voisines mais la précision des mesures ne permet pas d'affirmer que l'une est supérieure à l'autre.



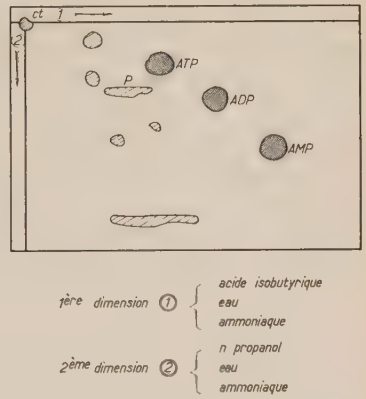


FIG. 5. — Variations, au cours de la journée, de la radioactivité spécifique du glycérylphosphoglycérol (GPG), de la glycérylphosphorylsérine (GPS) et de la glycérylphosphorylcholine (GPC) provenant des plastes. Feuilles de Tabac mises en présence de ^{32}P pendant 30 mn et ensuite sur eau distillée.

FIG. 6. — Répartition du ^{32}P dans les nucléotides et acides nucléiques extraits du complexe total provenant de feuilles de Tabac mises pendant 30 mn sur ^{32}P, puis prélevées 5 h après un séjour sur milieu non radioactif, à la lumière.

Le GPG peut être un précurseur des GPS et GPC. FERRARI et BENSON (1961) suggèrent que le phosphatidylglycérol est le donneur de groupes phosphatidiques pour l'inositol, la choline ou l'éthanolamine. D'après ces auteurs, les réactions peuvent être formulées comme suit :

phosphatidylglycérol + enzyme ⇋ phosphatidylenzyme + glycérol
phosphatidylenzyme + inositol ⇋ phosphatidylinositol + enzyme

phosphatidylglycérol + inositol ⇋ phosphatidylinositol + glycérol

La séparation des phospholipides par le mélange éther-alcool v/v, à partir des précipités lyophilisés, entraîne le SDS qui est lié au complexe pigmentaire. La fraction éther-alcool contient alors les phospholipides et le SDS. Après évaporation à sec et reprise par l'éther éthylique, seuls les phospholipides passent dans l'éther. Par centrifugation, on obtient un culot blanc de SDS. Le dosage du SDS par la rosaniline donne les rapports suivants entre le SDS et la chlorophylle, pour chacun des précipités :

Fraction précipitée par	Molécules de SDS / Molécules de chlorophylle
5 % $(NH_4)_2SO_4$	39
10 % $(NH_4)_2SO_4$	26
15 % $(NH_4)_2SO_4$	27

Analyse des nucléotides et des acides nucléiques

Les précipités et l'extrait total, traités par le mélange éther-alcool et ainsi dépourvus de phospholipides, sont repris dans de l'eau distillée. Après centrifugation, le surnageant contient la plus grande partie de la radioactivité attribuée aux nucléotides-acides nucléiques. Les culots sont ensuite soumis à l'action de l'acide trichloracétique à 5 %, qui extrait fort peu de composés radioactifs. Aussi les extraits aqueux et trichloracétique réunis sont-ils analysés ensemble. Les pourcentages de la radioactivité attribués aux nucléotides et acides nucléiques figurent dans les tableaux III, V et VII.

Après élimination de l'acide trichloracétique par l'éther éthylique, puis concentration, une chromatographie à deux dimensions est effectuée, comme il est indiqué p. 000.

Dans l'extrait total, l'ATP, l'ADP, et l'AMP marqués au ^{32}P sont décelés. Ces substances ont été identifiées par cochromatographie (fig. 6).

Les méthodes utilisées n'ont pas permis l'étude quantitative et l'identification complète des autres constituants présents dans cette fraction.

Le résidu insoluble dans l'acide trichloracétique chaud, obtenu après l'extraction des phospholipides, des nucléotides et des acides nucléiques, est principalement constitué par les protéines et les phosphoprotéines. Il contient 10 μg de P par mg de chlorophylle attribués aux phosphoprotéines. Ce résidu n'a pas été analysé en détail.

Les expériences montrent que le complexe isolé par Smith à l'aide du SDS comprend non seulement l'ensemble des pigments et des protéines du chloroplaste mais également la totalité des phospholipides. Au cours de la solubilisation du matériel chloroplastique, le SDS ne rompt donc pas les liaisons qui existent entre protéines et phospholipides. Les liaisons protéines-phospholipides sont ioniques. Il en est de même des liaisons entre le SDS et les protéines, comme l'ont montré Putnam et Neurath (1948). D'après ces auteurs, le nombre de molécules de SDS fixées par une protéine est égal au nombre de charges positives de cette dernière.

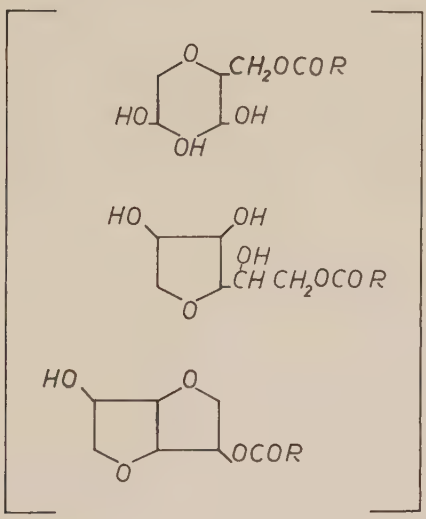
Dans les expériences présentes, le SDS ne se substituant pas aux molécules de phospholipides au cours des manipulations, il faut admettre que les liaisons SDS-protéines sont moins fortes que les liaisons phospholipides-protéines.

Par contre, le SDS rompt les liaisons unissant les acides nucléiques et les nucléotides aux chromoprotéines. Il permet une séparation immédiate des nucléotides et des acides nucléiques liés aux autres substances chloroplastiques.

ACTION DU TWEEN 20

Le détergent Tween 20 (polyoxyéthylène sorbitan monolaurate) dérive du Span par addition de chaînes polyoxyéthyléniques aux hydroxyles non estérifiés.

Span



R = résidu acide gras

Traitement des chloroplastes par le Tween 20

L'action dispersive de ce détergent non ionique est plus lente que celle du SDS qui est immédiate et totale. Cependant, avec une solution de Tween 20 à 25 % dans du tampon phosphate 0,01 M à pH 8,3, on obtient, après une heure de contact, la dispersion complète du matériel chloroplastique qui peut renfermer jusqu'à 400 μg de chlorophylle par ml. Pour l'extraction, des concentrations de Tween inférieures à 25 % ont été essayées. Après centrifugation à 30 000 g, il reste alors un important culot vert de plastes non dispersés. Quoique le Tween ne soit pas ionisé, le pH a une nette influence sur la dispersion, qui est maximum aux pH supérieurs à 8. Après une extraction au Tween à 25 %, la centrifugation à 30 000 g pendant 1 h donne un surnageant vert dont le maximum d'absorption dans le rouge est à 669 mμ et un culot blanc. Ce dernier renferme de l'amidon et des protéines (15 à 20 % de l'azote protéique total des plastes).

Les études sur l'extrait au Tween portent sur les liaisons entre pigments, phospholipides et protéines. Les liaisons où interviennent les nucléotides et les acides nucléiques n'ont pas été étudiées.

Le sulfate d'ammonium ne permet pas d'obtenir différents précipités à partir de l'extrait initial, car le Tween 20 donne un floculat blanc avec ce sel.

L'extrait au Tween, mis en présence d'un égal volume d'acétone froid, laisse précipiter des protéines. Après centrifugation, on obtient un culot protéique blanc et un surnageant vert où se trouvent les pigments et le Tween. Le culot est traité plusieurs fois par le mélange alcool-éther (v/v) puis les extraits sont réunis, désséchés, et le résidu redissous dans l'éther éthylique. Ce résidu ne renferme pas de phosphore, il ne contient pas de phospholipides. Ceux-ci ont donc été séparés des protéines. Ils se trouvent avec les pigments. Ces derniers peuvent être facilement extraits du mélange Tween-acétone par l'éther éthylique. Il n'en est pas de même des phospholipides, qui ne passent pas dans la phase éther éthylique, mais restent en solution avec le Tween. Ce fait a été vérifié sur un extrait comprenant l'ensemble des substances liposolubles des chloroplastes. L'extrait sec est solubilisé par le Tween à 25 %. En ajoutant à la solution un égal volume d'acétone, on obtient une seule phase, qui reste limpide. Après addition d'éther éthylique, agitation et décantation, il se forme deux phases. Tous les pigments se retrouvent dans l'éther, tandis que 80 à 90 % des phospholipides restent avec le Tween et l'acétone qui constituent la phase inférieure.

Chromatographie de l'extrait au Tween 20, sur DEAE cellulose

L'extrait au Tween 20 a été chromatographié sur colonne de poudre de cellulose échangeuse d'anions (DEAE cellulose, Pharmacia, Uppsala) afin de retenir les protéines et de les débarrasser du Tween, des pigments et des phospholipides. Environ 10 g de poudre DEAE cellulose pour 100 mg de protéines ont été utilisés. La poudre, en suspension dans du tampon phosphate 0,01 M à pH 8,3, est versée dans une colonne à chromatographie où elle se décante pour former un cylindre homogène dont le rapport du diamètre à la longueur est égal à 1/15. Puis elle est lavée avec le tampon jusqu'à ce que l'éluat garde le même pH. Ensuite, elle est imprégnée de Tween dilué à 25 % dans le tampon. Le volume de liquide utilisé est égal au triple du volume de la colonne. L'extrait chloroplastique est alors déposé au sommet. Lorsque tout l'extrait a pénétré dans la cellulose, on rince la colonne avec le Tween à 25 %, jusqu'à ce que l'éluat soit incolore. Dans ces conditions, la plus grande partie des pigments est éliminée. Il ne reste avec la cellulose que 15 à 20 % de la chlorophylle totale déposée. Les protéines ont été retenues par la poudre de cellulose et l'éluat n'en renferme pas. Pour les éluer, une solution de tampon phosphate 0,01 M à pH 8,3, à laquelle sont ajoutées des quantités croissantes de NaCl (jusqu'à la concentration 0,1 M) est versée sur la colonne. Dans les fractions recueillies, 20 à 30 % seulement des protéines déposées sur la colonne sont retrouvées. Ces protéines sortent toutes ensemble, elles sont légèrement polluées de chlorophylle. Des concentrations plus fortes en NaCl ou en tampon ne permettent pas une élution plus importante.

Pour déterminer la localisation des phospholipides, après ces manipulations, la colonne de DEAE utilisée est lavée par 8 à 10 fois son volume d'une solution d'éther-alcool (v/v). Le dosage n'a pas révélé la présence de phospholipides dans l'extrait éther-alcool. Les phospholipides sont passés avec le Tween et les pigments, comme l'ont montré les résultats obtenus après marquage par le ^{32}P.

Le Tween provoque donc une rupture des liaisons entre les différents pigments et phospholipides d'une part et les protéines d'autre part.

Electrophorèse de l'extrait au Tween 20, sur gélose

Le support pour l'électrophorèse est obtenu en mélangeant à volumes égaux une solution de gélose à 2 % dans de l'eau distillée et du tampon véronal à pH 8,6 (Olivier 1961). La préparation est faite à la température de 50-60 °C. La composition du tampon est la suivante :

Véronal sodique	10,3 g
Véronal acide	1,84 g
Eau distillée	quantité suffisante pour 1 000 ml
Force ionique	0,05

L'épaisseur du support est de 4 mm. L'électrophorèse est effectuée sous 400 volts pendant 3 heures. Les protéines sont révélées à l'aide de l'amido-black (Bier, 1959). Les bandes d'électrophorèse sont plongées pendant 10 minutes dans la solution suivante :

Amido-black 10 B	0,1 % en poids
Acide acétique glacial	1 volume
Alcool méthylique	9 volumes.

Les bandes sont ensuite rincées avec le mélange acide acétique glacial-alcool méthylique (1 : 9 v/v). Les protéines fixent l'amido-black et forment une tache bleu foncé sur un fond bleu pâle.

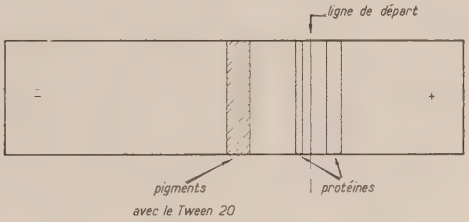


Fig. 7. — Schéma de l'électrophorèse sur gélose de l'extrait au Tween 20. Support de gélose épaisseur 4 mm. Tampon véronal pH 8,6. Force ionique 0,05. Tension 20 V/cm. Temps 3 h.

Au cours de l'électrophorèse, les pigments émigrent avec le Tween vers le pôle négatif. La majeure partie des protéines se retrouve par contre vers le pôle positif comme le montre la figure 7.

Afin de pouvoir doser les protéines, une électrophorèse est effectuée également sur une colonne de gélose. L'appareil utilisé est représenté dans la figure 8.

Grâce à cette technique, 80 % des protéines sont récupérées. Elles sont débarrassées des pigments et du Tween qui a servi à l'extraction. Ces dernières substances ont émigré ensemble vers le pôle négatif en pénétrant dans la colonne de gélose. On constate que 60 % des protéines obtenues sont insolubles dans le tampon utilisé et se trouvent sous la forme d'un précipité au sommet de la colonne.

Il semble que le Tween 20 permette de distinguer 3 catégories de protéines. Les unes ne sont pas dispersées lors de l'action du détergent sur les chloroplastes. Elles restent dans le culot blanc après la centrifugation qui suit le traitement par le Tween 20. D'autres, solubles en l'absence de détergent, sont fixées par la DEAE

cellulose, puis éluées par NaCl. On peut également les séparer par électrophorèse sur gélose. D'autres enfin, insolubles en l'absence de Tween, non éluées de la DEAE cellulose, restent aussi sous forme d'un précipité sur la colonne d'électrophorèse.

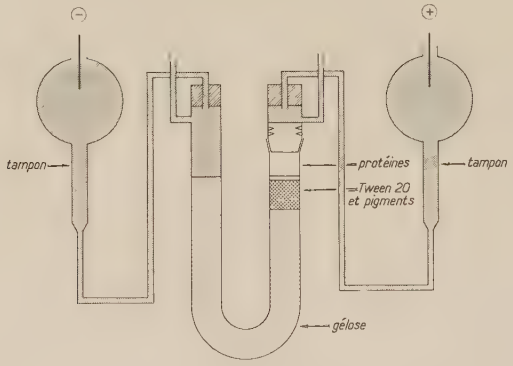


FIG. 8. — Electrophorèse sur colonne de gélose de l'extrait au Tween 20. Tampon véronal pH 8,6. Force ionique 0,05. Tension 20 V/cm. Temps 4 h.

Les études faites avec le Tween ont montré que ce détergent rompt non seulement les liaisons des pigments et des protéines mais également celles des phospholipides et des protéines.

DISCUSSION

Les expériences précédentes ont donné un exemple des renseignements que l'on peut obtenir sur les liaisons des différents constituants biochimiques des plastes, grâce à l'emploi des détergents. Le SDS disperse les substances des plastes sans rompre les liaisons entre phospholipides, pigments et protéines. Seuls les acides nucléiques et les nucléotides sont détachés des complexes protéines - pigments. Cette propriété du SDS, de séparer les acides nucléiques des protéines, se révèle générale.

Par contre le Tween 20 provoque non seulement une rupture des liaisons entre les protéines et les pigments, mais détache également les phospholipides des protéines. Il est intéressant de rapprocher ces observations de celles de SMITH et PICKELS (1941) sur l'action du désoxycholate. Ces auteurs ont montré que ce détergent sépare les pigments des protéines. Comme on sait par ailleurs qu'il se combine aux phospholipides pour former des complexes solubles, il serait intéressant de vérifier si le désoxycholate sépare aussi les phospholipides des protéines.

Enfin, l'action d'un détergent sur les plastes dépend non seulement de sa nature mais aussi des conditions dans lesquelles on le fait agir. Avec le SDS, suivant la concentration utilisée, on obtient des résultats différents. En prenant 10 mg de SDS par mg de chlorophylle, on a une dispersion complète du matériel chloroplastique. Le complexe obtenu a un maximum d'absorption à 670 mμ. Que l'on soumette cet extrait à l'électrophorèse ou à la précipitation par le sulfate d'ammonium, on ne peut séparer des fractions différentes. Par contre, avec une quantité de SDS de 3 mg par mg de chlorophylle, on disperse seulement une partie du matériel chloroplastique, l'autre partie pouvant être dispersée avec 10 mg de SDS par mg de chlorophylle. Les deux complexes ainsi obtenus sont différents (BROWN et DURANTON, 1964). Le

premier a un maximum d'absorption à 680 mμ, le second à 670 mμ. Des différences s'observent également à l'analyse biochimique. Le complexe absorbant à 680 mμ à un rapport $\frac{\text{chlorophylle } a}{\text{chlorophylle } b}$ plus grand et un rapport $\frac{\text{protéines}}{\text{chlorophylles}}$ également plus élevé. Par contre, la quantité de xanthophylles est inférieure à celle qui se trouve dans le complexe absorbant à 670 mμ.

Une séparation partielle comparable de deux complexes chromoprotéiques a été obtenue à partir des chromatophores de *Rhodopseudomonas spheroides* par BRIL (1958). Avec le Triton X 100, cet auteur a séparé deux complexes, l'un a son maximum d'absorption à 850 mμ, l'autre à 880 mμ.

FORMATION DES CHLOROPLASTES AU COURS DU VERDISSEMENT DES PLANTULES ÉTIOLÉES

La membrane interne entourant les jeunes proplastes des feuilles étiolées donne naissance à des vésicules. A l'obscurité, ces dernières s'assemblent pour former le corps prolamellaire qui, dans certains cas, peut avoir l'aspect d'un réseau cristallin. La lumière provoque la désagrégation de cet ensemble en nouvelles vésicules qui donneront, avec l'apparition de la chlorophylle, les lamelles et les granums. L'exposition à la lumière a donc au moins deux conséquences : le verdissement et un bouleversement complet de la structure des proplastes. Von WETTSTEIN (1961) a observé les différentes phases du développement des proplastes à l'obscurité et les transformations qui apparaissent ensuite à la lumière. Ses observations sont résumées dans la figure 9.

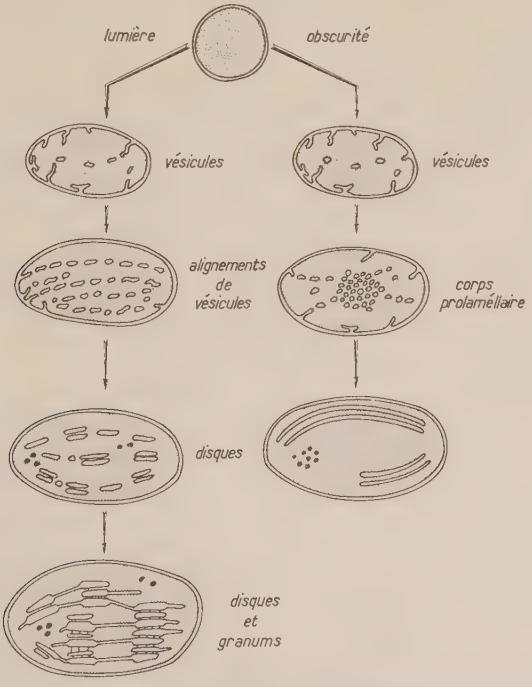


FIG. 9. — Diagramme, d'après Von WETTSTEIN (1961), montrant le développement des plastes dans les plantes à la lumière et à l'obscurité.

Au cours du verdissement, la chlorophylle se trouve liée avec un complexe comprenant des protéines, des lipides et des acides nucléiques. Les pages qui suivent ont trait à l'étude de ces diverses substances.

De nombreux travaux ont été effectués, qui associent à la synthèse chlorophyllienne une synthèse concomitante de protéines. C'est ce que décrivent De Deken Grenson (1954, 1955) à propos du verdissement de feuilles de Chicorée et Brawerman et Chargaff (1959 *a*, *b*, *c*), Brawerman, Pogo et Chargaff (1962) dans leurs études sur *Euglena gracilis*. Ces derniers auteurs constatent que les protéines augmentent de 40 % en masse dans les plastes lorsque les Euglènes étiolées verdissent au cours d'une exposition de 48 heures à la lumière.

Matériel et techniques

Des grains de *Zea Mays* L (variété I.N.R.A. 260), après trempage d'une journée dans l'eau, sont mis à germer sur terreau, en serre, à 25 °C et à l'obscurité. Les jeunes plantes obtenues sont prélevées lorsqu'elles ont 2 ou 3 feuilles, selon les expériences. Il faut compter de 9 à 10 jours pour que les plantes aient leur 3e feuille et 12 jours pour qu'apparaisse la 4e.

Les manipulations sont effectuées soit sur les 2e, soit sur les 2e et 3e feuilles, les premières étant écartées. Les prises servant aux analyses correspondent à 10 g de substance fraîche (30 à 40 plantes sont nécessaires).

Obtention et analyse des plastes

Après pesée et mesure de leur surface, les limbes sont broyés au mortier, à 4 °C, en présence d'un peu de sable de Fontainebleau et d'une solution de NaCl 0,35 M sans tampon. Pour 10 g de limbes frais, 50 ml de solution de NaCl sont utilisés. La durée du broyage est de l'ordre de 2 à 3 minutes. Le filtrat obtenu après passage du broyat sur étamine, est soumis à une centrifugation de 1 000 g pendant 1 minute(1). On obtient un culot C_1 comprenant des fragments cellulosiques, des noyaux, une fraction des chloroplastes et un surnageant S_1. Ce dernier est soumis à nouveau à une centrifugation de 1 000 g pendant 30 minutes, ce qui donne le culot C_2 et le surnageant S_2. Une dernière centrifugation à 100 000 g pendant 90 minutes permet d'obtenir, à partir de S_2, un culot C_3 contenant le reste des plastes avec l'ensemble des mitochondries et un surnageant S_3 qui contient les éléments du cytoplasme et des protéines solubles des plastes. Les manipulations précédentes sont résumées dans le schéma suivant.

Filtrat
1 minute à 1 000 g ⟶ culot C_1

↙
Surnageant S_1
30 minutes à 1 000 g ⟶ culot C_2

↙
Surnageant S_2
90 minutes à 100 000 g ⟶ culot C_3

↙
Surnageant S_3

(1) La centrifugation à la centrifugeuse Servall dure en tout 5 mn, dont 1 mn pour atteindre les 1 000 g et 3 mn pour la décélération.

Le culot C_2 est remis en suspension dans une solution de NaCl 0,35 M et centrifugé à nouveau afin de le débarrasser du cytoplasme qui l'accompagne. Sur cette fraction qui se révèle, à l'examen microscopique, pratiquement exempte de noyaux et de mitochondries, sont effectués les dosages de l'azote protéique. A l'observation microscopique, les proplastes jaunes ne diffèrent pratiquement pas en taille des plastes verts. L'azote protéique provenant du culot C_2 est appelé N *chromoprotéique* des plastes. En effet, dans le culot C_2 se trouve principalement les protéines liées aux pigments. Les protéines solubles se sont pour la plupart échappées des plastes au cours de leur séparation en solution aqueuse.

Le culot C_2 est soumis aux techniques d'extraction décrites par Brawerman, Pogo et Chargaff (1962). Après avoir extrait les pigments par l'acétone à 80% on traite l'insoluble, séparé par centrifugation, par une solution de $HClO_4$ M à 4 °C. On laisse en contact avec l'acide pendant trois jours à cette même température, puis centrifuge et recueille le surnageant. Le résidu est lavé deux fois avec $HClO_4$M. Les liquides sont réunis afin d'y doser l'ARN. Le précipité contenant les protéines est traité ensuite deux fois par $HClO_4$ 0,5 M, à 70 °C pendant 20 minutes pour extraire l'ADN. Les protéines, qui se trouvent dans le résidu insoluble, sont minéralisées par l'acide sulfurique à chaud en présence du catalyseur de Dumazert et Marcelet (1938) et l'azote qu'elles renferment est dosé soit au Nessler (Thompson et Morrisson, 1951), soit après distillation de l'ammoniaque selon la microméthode de Parnas et Wagner. Les acides nucléiques sont déterminés par la méthode d'Ogur et Rosen (1950). Les quantités de chlorophylles sont calculées d'après les densités optiques de l'extrait acétonique à 80 %, en appliquant la formule de MacKinney (1941).

Les dosages s'effectuent sur une partie aliquote du culot C_2. Mais ce dernier ne comprend qu'une fraction des *protéines holochromes* des feuilles utilisées, le reste se trouvant dans les culots C_1, C_3 et sur l'étamine ayant servi à la filtration du broyat. L'évaluation de la totalité des *protéines holochromes* des plastes est faite d'après les rapports des quantités de chlorophylles (feuilles verdies) et d'après les rapports des quantités de caroténoïdes (feuilles étiolées) contenues dans les fractions.

Même avec un bon broyage des feuilles, il reste de 20 à 30 % des pigments sur étamine après filtration, c'est-à-dire de 20 à 30 % des *protéines holochromes*.

Le surnageant S_3 comprent les protéines du cytoplasme et des protéines provenant du stroma des plastes. Dans un souci de simplification toutes les protéines de ce surnageant sont appelées *protéines cytoplasmiques*. Elles sont obtenues par précipitation à froid à l'aide de l'acide trichloracétique jusqu'à la concentration finale de 5 %. Le culot, après centrifugation, est débarrassé des acides nucléiques et lavé deux fois avec de l'acide trichloracétique à 5 %. Le dosage de l'azote est ensuite effectué.

Expression des résultats

Les résultats obtenus sont calculés par rapport à l'unité de surface des feuilles. La surface est un bon reflet de la quantité de tissu foliaire et elle est facile à déterminer. La masse de substance fraîche présente des variations suivant l'état des plantes et des conditions du milieu. Cependant, ramenée à l'unité de surface, la masse est sensiblement la même pour les limbes étiolés et pour les limbes verts, soit 1,6 g/dm^2 en moyenne. La teneur en eau chez les uns comme chez les autres est très voisine : 1 150 pour 100 de substance sèche.

Résultats

Répartition des plastes au cours des centrifugations

L'étude de la répartition des plastes, dans les différents culots de centrifugation des broyats de limbes étiolés ou verdis, permet d'observer si proplastes et chloroplastes se sédimentent de la même façon.

Si l'on dose dans les différentes fractions la chlorophylle chez les plantes vertes, les caroténoïdes chez les plantes jaunes, on constate que les surnageants S_3 ne renferment aucun de ces pigments. Tous les caroténoïdes des feuilles étiolées se trouvent dans les plastes et non dans le cytoplasme, contrairement à ce qu'indique GOODWIN (1959) pour d'autres variétés de Maïs. Après avoir ajouté au surnageant S_3 quatre volumes d'alcool éthylique, écarté le précipité blanc formé, puis agité la solution alcoolique en présence d'éther éthylique, on constate en effet au spectrophotomètre qu'il n'y a pas de caroténoïdes dans la phase éthérée après décantation. Les pourcentages de pigments présents dans les culots de centrifugation C_1, C_2 et C_3, exprimés par rapport à la quantité totale contenue dans le filtrat, sont indiqués dans le tableau VIII.

TABLEAU VIII

Répartition des pigments dans les culots de centrifugation

Culots de centrifugation	Limbes verts	Limbes étiolés
	Quantités de chlorophylles en % des chlorophylles du filtrat	Quantités de caroténoïdes en % des caroténoïdes totaux du filtrat
C_1	37 %	24 %
C_2	34 %	27 %
C_3	29 %	49 %

Si l'on admet que la répartition des pigments dans les différents culots représente celle des plastes, le tableau VIII montre que les chloroplastes se sédimentent plus rapidement que les proplastes.

Le rapport des quantités d'N protéique des culots C_2 obtenus à partir de masses égales de limbes verts et de limbes étiolés, ne correspond donc pas au rapport des quantités totales de *protéines holochromes* dans les deux sortes de limbes.

Répartition de l'azote protéique dans les limbes de plantes vertes et de plantes étiolées

Les jeunes Maïs cultivés à l'obscurité sur terreau, sont coupés au niveau du premier nœud lorsqu'ils ont trois feuilles. Les parties aériennes ont leur base plongée dans de l'eau distillée. Deux lots identiques sont constitués, l'un est laissé à l'obscurité et l'autre soumis à la lumière continue durant 24 ou 48 heures. Au moment des prélèvements, la première feuille de chaque partie aérienne est écartée. Elle correspond à la feuille la plus âgée et présente une synthèse de la chlorophylle très lente.

Le verdissement est plus ou moins rapide suivant la température dont l'effet est très sensible. A basse température, 5 à 10 °C pour des éclairements de 2 000 à 3 000 lux, le verdissement ne s'effectue pas ou est extrêmement lent. A 25 ou 30 °C par contre, et pour les mêmes éclairements, le taux de chlorophylle atteint après 24 heures 70 % du taux normal qui correspond à 1,5 à 2 mg de chlorophylle par décimètre carré de limbe.

De nombreux travaux ont montré que le métabolisme des substances azotées de feuilles détachées est caractérisé par la diminution rapide des protéines qu'elles renferment et par un accroissement correspondant de substances solubles. (YEMM, 1937 ; VICKERY, PUCHER, WAKEMAN, LEAVENWORTH, 1937 ; MCKEE, 1950 ; MOYSE, 1950). Afin de déterminer l'ampleur de la protéolyse dans les expériences présentes, la répartition de l'N a été comparée entre des limbes provenant de parties aériennes placées sur eau distillée et des limbes de même âge provenant de plantes entières.

Après un séjour de 24 heures sur eau distillée, les parties aériennes ne présentent pas de variations significatives de leur quantité d'N total (voir tableau IX).

TABLEAU IX

N total des limbes exprimé en mg/dm²

Expérience	Verts		Etiolés	
	Plantules entières	Parties aériennes, après 24 h sur eau distillée	Plantules entières	Parties aériennes, après 24 h sur eau distillée
1	4,6 mg/dm²	4,6 mg/dm²	5,8 mg/dm²	5,6 mg/dm²
2	4,5 mg/dm²	4,8 mg/dm²	4,8 mg/dm²	4,8 mg/dm²
3	4,7 mg/dm²	4,4 mg/dm²	5,0 mg/dm²	5,0 mg/dm²

Les variations des teneurs en N total, d'une expérience à l'autre, ne dépassent pas 20 %. Elles sont dues à l'état physiologique des organes, à leur âge. Les limbes de plantes très jeunes renferment par exemple plus d'azote par unité de surface que les limbes de plantes plus âgées.

Les quantités d'N *chromoprotéique* par unité de surface sont pratiquement identiques dans le matériel végétal vert ou étiolé :

Limbes étiolés 1,7 mg/dm²

Limbes normaux 1,8 mg/dm²

L'égalité se maintient pendant le début de la chlorophyllogenèse. Elle subsiste encore lorsque les limbes ont des teneurs en chlorophylle de 1,45 mg/dm² ce qui représente 80 % de la teneur normale.

Parallèlement, le séjour sur l'eau distillée, pendant 24 heures, ne semble pas entraîner une perte importante des *protéines holochromes* des plastes. Pour les plastes jaunes comme pour les plastes verts, les diminutions ne dépassent pas 5 % lorsque les plantes utilisées sont jeunes et que les parties aériennes restent turgescentes pendant l'expérience. Les pertes d'N par contre peuvent atteindre 20 % du taux initial lorsque les plantes utilisées sont âgées.

Pour les limbes des plantes étiolées et des plantes vertes, la quantité d'N des *protéines cytoplasmiques* est sensiblement la même, soit 1,3 mg/dm². Le traumatisme dû à la section et à la mise des parties aériennes sur eau distillée provoque une perte d'environ 10 % des *protéines cytoplasmiques*. L'état physiologique des plantes intervient pour les vertes et pour les étiolées. Les variations sont faibles lorsque les plantes ont été placées dans de bonnes conditions de culture et lorsqu'elles sont jeunes. Pour des plantes âgées, par contre, l'hydrolyse des *protéines cytoplasmiques* peut atteindre jusqu'à 40 % de la quantité initiale.

Le tableau X présente la répartition de l'N *chromoprotéique* des plastes et de l'N des *protéines cytoplasmiques* exprimée en pourcentage par rapport à l'N total des limbes.

Tableau X

Répartition dans les limbes de plantes vertes et étiolées de l'N des protéines holochromes des plastes et des protéines cytoplasmiques en % de l'N total

Fraction analysée	Limbes verts	Limbes étiolés
N *chromoprotéique*	40 %	34 %
N des *protéines cytoplasmiques*	28 %	26 %
N soluble	32 %	40 %

Métabolisme de l'N *chromoprotéique* des plastes pendant le verdissement

Les résultats précédents ont été complétés par l'étude de l'incorporation de composés radioactifs dans les protéines. Pendant le verdissement, le bilan de l'N *chromoprotéique* peut en effet rester constant bien que des modifications profondes aient lieu sous forme d'un remaniement ou d'un renouvellement des *protéines holochromes*.

Les substances utilisées ont été le sulfate ^{35}S, la cystéine ^{35}S, la glycine $2^{14}C$, la lysine $6^{14}C$. Dans toutes les expériences deux lots identiques comprenant les parties aériennes de jeunes plantes sont placés l'un à la lumière, l'autre à l'obscurité. Dans chaque lot les quantités d'acides aminés libres, de protéines des plastes et du cytoplasme sont sensiblement égales, ce qui entraîne une dilution identique de la substance marquée fournie. De ce fait, les activités incorporées dans les protéines peuvent être assimilées à des activités spécifiques, les quantités de protéines pendant l'expérience restant pratiquement constantes dans les différentes fractions isolées des limbes, qu'ils soient laissés à l'obscurité ou mis à la lumière.

Incorporation de ^{35}S dans les substances organiques, pendant le verdissement

Deux lots de 5 g de substance fraîche sont contitués par des parties aériennes de Maïs étiolés. Les bases des feuilles sont plongées dans une solution de $H_2{}^{35}SO_4$ sans entraîneur, neutralisée par NH_4OH (acidité de la solution avant neutralisation environ N/100 ; radioactivité de la solution 10 mCi/ml ; radioactivité spécifique supérieure à 1 mCi/μg). Les deux lots restent en contact pendant 4 heures avec le $^{35}SO_4^{--}$, l'un (*O*) à l'obscurité, l'autre (*L*) à la lumière. Ce temps écoulé, la solution radioactive est remplacée par de l'eau distillée. Les lots sont analysés 20 h après. Pendant les 24 heures, 3 mg de chlorophylle ont été synthétisés dans les limbes du lot (*L*), soit 1 mg de chlorophylle par dm^2, ce qui correspond à 50 % de la teneur normale.

Les *protéines holochromes* des plastes sont obtenues à partir du culot de centrifugation C_2. Ce dernier est lavé une fois avec une solution de NaCl 0,35 M. Après extraction des pigments et des lipides par le mélange éther-alcool, le culot protéique est à nouveau lavé deux fois par une solution d'acide trichloracétique à 5 %, à froid. La radioactivité du résidu insoluble est mesurée sans minéralisation préalable. Pour le ^{35}S, le rendement du compteur utilisé est de 30 %.

La radioactivité des *protéines cytoplasmiques* du surnageant S_3 est mesurée à

partir du précipité obtenu par l'action de l'acide trichloracétique, à la concentration finale de 5 %. Avant la mesure de la radioactivité, le précipité de protéines est lavé deux fois par de l'acide trichloracétique à 5 %.

La radioactivité trouvée dans les limbes se répartit de la façon suivante (Tableau XI).

TABLEAU XI

Répartition de la radioactivité due au ^{35}S, dans des limbes étiolés soumis à 24 h de lumière continue (L) ou à 24 h d'obscurité (O)

La radioactivité totale de l'ensemble des limbes de chaque lot est d'environ 10^7 i.p.m. Résultats exprimés en % de la radioactivité totale des limbes.

Fractions analysées	Limbes *L*	Limbes *O*	$\frac{\text{Radioactivité } L}{\text{Radioactivité } O}$
Protéines holochromes des plastes	7 %	2,4 %	2,9
Protéines cytoplasmiques	6,4 %	2,3 %	2,8
Substances liposolubles	3,7 %	1,4 %	2,6
Surnageant S_3 déprotéinisé.....	82,9 %	93,9 %	

Dans le tableau XI, comme dans les suivants, la radioactivité du surnageant S_3 déprotéinisé est calculée et non mesurée.

Le métabolisme du S est plus rapide dans les limbes mis à la lumière que dans les limbes laissés à l'obscurité. C'est ce que reflètent les valeurs du rapport $\frac{\text{radioactivité } L}{\text{radioactivité } O}$

L'édification de la structure lamellaire et granaire ne semble pas nécessiter un apport plus grand de matériaux soufrés, que l'édification des autres structures cellulaires.

Les résultats suivants, obtenus avec des acides aminés marqués, confirment ces observations.

INCORPORATION DES ACIDES AMINÉS MARQUÉS PENDANT LE VERDISSEMENT

Cystéine ^{35}S

Deux lots identiques d'environ 7 g de substance fraîche sont constitués par des parties aériennes de Maïs étiolés. Les bases des feuilles sont plongées dans 10 ml d'une solution de cystéine ^{35}S (3×10^5 i.p.m./ml) dont la radioactivité spécifique n'est pas connue. Les deux lots restent en contact pendant 3 h avec la solution puis pendant 21 h avec de l'eau distillée, l'un à la lumière, l'autre à l'obscurité. Les limbes éclairés contiennent alors 5 mg de chlorophylle. Cette quantité correspond à environ 60 % de la teneur normale. Le tableau XII indique comment se répartit la radioactivité dans les limbes.

La radioactivité de l'extrait éthéro-alcoolique comprenant les phospho-, sulfolipides et les pigments est assez faible (de l'ordre de 1 %).

Il n'y a pas une différence sensible dans la répartition du ^{35}S, dans les protéines des deux fractions chromoprotéiques et cytoplasmiques, que les limbes aient été

à l'obscurité ou à la lumière. Nous avons seulement, comme précédemment, une exaltation globale du métabolisme sous l'action de la lumière.

TABLEAU XII

Répartition de la radioactivité provenant de la cystéine ^{35}S, dans des limbes étiolés soumis à 24 h de lumière continue (L) ou à 24 h d'obscurité (O)

Radioactivité exprimée en i.p.m. et en % de la radioactivité totale des limbes.

Fractions analysées	Limbes *L*		Limbes *O*		Radioactivité *L* / Radioactivité *O*
	radio-activité	%	radio-activité	%	
Ensemble des limbes.....	394 000		249 700		
Protéines holochromes des plastes	60 800	15 %	24 600	10 %	1,5
Protéines cytoplasmiques	63 500	16 %	24 700	10 %	1,6
Surnageant S_3 déprotéinisé	269 700	69 %	200 400	80 %	

Glycocolle 2 ^{14}C

Le glycocolle 2 ^{14}C a été également utilisé, comme précurseur immédiat, dans la synthèse protéique et dans la synthèse du noyau tétrapyrrolique de la chlorophylle. Une incorporation de ^{14}C particulièrement importante dans les pigments des limbes exposés à la lumière est à prévoir.

Deux lots identiques (5 g de matière fraîche), sont placés pendant 4 heures sur 10 ml d'une solution aqueuse contenant 0,04 mCi de glycocolle d'activité spécifique 3,7 mCi/mM, l'un à l'obscurité, l'autre à la lumière. Après les 4 heures la solution radioactive est remplacée par de l'eau distillée. Le prélèvement est effectué 24 heures après le début de l'expérience. Le lot soumis à un éclairement continu a synthétisé 3 mg de chlorophylle. Les analyses sont effectuées comme précédemment. Le tableau XIII indique la répartition de la radioactivité dans les limbes.

Si la répartition de la radioactivité dans les limbes étiolés ou en plein verdissement est différente, les rapports entre les radioactivités trouvées dans les fractions extraites des limbes verts et les fractions correspondantes des limbes étiolés montrent seulement une exaltation du métabolisme à la lumière. Les transformations importantes qui s'effectuent dans les plastes au cours du verdissement ne semblent pas nécessiter un apport particulier de matériaux vers les plastes. Les observations sont concordantes, qu'il s'agisse de l'assimilation du $^{35}SO_4^{--}$, de la cystéine ou du glycocolle.

La fraction appelée *protéines cytoplasmiques* contient les protéines du cytoplasme et la majeure partie des protéines solubles des plastes. On peut se demander si ce ne sont pas ces dernières qui sont synthétisées abondamment au cours du verdissement. Ce fait est peu probable pour deux raisons. En effet les quantités de *protéines holochromes* d'une part (1,7 et 1,8 mg/dm^2) et de *protéines cytoplasmiques* (1,3 mg/dm^2) d'autre part sont sensiblement égales dans les limbes étiolés et dans les limbes verts. Les quantités de protéines solubles des plastes étiolés ou verts sont donc soit les mêmes, soit très peu différentes. La deuxième raison tient aux rapports semblables

de la radioactivité dans les *protéines holochromes* et dans les *protéines cytoplasmiques* des limbes étiolés et verdis. La synthèse, prépondérante d'une protéine soluble particulière aux plastes verts, protéine à forte radioactivité spécifique, devrait modifier cette répartition. Or ce n'est pas le cas.

TABLEAU XIII

Répartition de la radioactivité provenant du glycocolle 2 ^{14}C dans des limbes étiolés soumis à 24 h de lumière continue (L) ou à 24 h d'obscurité (O)

Radioactivité spécifique du glycocolle 2 ^{14}C : 3,7 mCi/mM.
Radioactivité exprimée en i.p.m. et en % de la radioactivité totale des limbes.

Fractions analysées	Limbes *L*		Limbes *O*		Radioactivité *L* / Radioactivité *O*
	radio-activité	%	radio-activité	%	
Ensemble des limbes.....	126 100		62 650		
Protéines holochromes des plastes	19 500	15,4 %	4 200	6,7 %	2,3
Protéines cytoplasmiques	11 900	9,5 %	3 200	5,1 %	1,9
Substances liposolubles	6 580	5,4 %	1 550	2,5 %	2,1
Surnageant S_3 déprotéinisé	88 020	69,7 %	53 750	85,7 %	

Le tableau XIII ne montre pas une intégration particulière du glycocolle dans les chlorophylles bien que ces pigments apparaissent en quantité abondante à la lumière. Il semble bien que les matériaux nécessaires à leur synthèse soient, pour la plupart, déjà en place dans le proplaste jaune.

Acide δ-amino-lévulique

Pour confirmer ce dernier résultat, de l'acide δ-amino-lévulique marqué sur l'atome de carbone cétonique a été donné aux limbes, avant de les faire verdir. Si la conclusion tirée de l'expérience avec le glycocolle est exacte, on ne doit pas trouver une incorporation beaucoup plus grande de l'acide δ-amino-lévulique dans les plastes qui verdissent, bien que cet acide soit un précurseur immédiat du noyau tétrapyrrolique.

Pour ces expériences, les parties aériennes de Maïs étiolés de 12 à 13 jours (3 ou 4 feuilles) sont utilisées. Deux lots identiques, d'environ 5 g de substance fraîche chacun, sont constitués et mis l'un à la lumière, l'autre à l'obscurité. Les bases des feuilles plongent d'abord 2 h dans 10 ml d'une solution aqueuse d'acide δ-amino-lévulique, puis 22 h dans de l'eau distillée. La solution renferme 100 μg d'acide par ml. La radioactivité spécifique de l'acide δ-amino-lévulique est de 4 mCi/mM. La radioactivité incorporée par les limbes pendant les 2 heures correspond à 70 μg ou 40 μg d'acide amino-lévulique. Pendant les 24 heures, les limbes exposés à la lumière ont synthétisé 1,5 mg de chlorophylle.

La répartition de la radioactivité trouvée dans les limbes est indiquée dans le tableau XIV.

Tableau XIV

Répartition de la radioactivité provenant de l'acide δ-amino-lévulique dans des limbes étiolés soumis à 24 h de lumière continue (L) ou à 24 h d'obscurité (O)

Radioactivité spécifique de l'acide δ-amino-lévulique : 4 mCi/mM.
Plantes de 13 jours. Radioactivité exprimée en i.p.m. et en % de la radioactivité totale.

Fractions analysées	Limbes *L*		Limbes *O*		Radioactivité *L* / Radioactivité *O*
	radio-activité	%	radio-activité	%	
Ensemble des limbes	1 385 000		1 160 000		
Protéines holochromes des plastes	40 000	3,2 %	69 500	6,6 %	
Protéines cytoplasmiques	37 700	3 %	44 600	4,2 %	
Substances liposolubles	663 500	53 %	426 400	41 %	1,3
Surnageant S_3 déprotéinisé	558 800	40,8 %	559 500	48,2 %	

Des expériences ont été effectuées dans les mêmes conditions, mais avec des plantules de 9 jours seulement et ayant 2 ou 3 feuilles. La quantité de matériel utilisé correspond à environ 5 g de matière fraîche pour chaque lot. Pour le lot mis 24 h en lumière continue, on retrouve dans les limbes 1,6 mg de chlorophylle. Les résultats des analyses sont exprimés dans le tableau XV.

Tableau XV

Répartition de la radioactivité provenant de l'acide δ-amino-lévulique dans des limbes étiolés soumis à 24 h de lumière continue (L) ou 24 h d'obscurité (O)

Radioactivité spécifique de l'acide δ-amino-lévulique 4 mCi/mM.
Plantes de 9 jours. Radioactivité exprimée en i.p.m. et en % de la radioactivité totale.

Fractions analysées	Limbes *L*		Limbes *O*		Radioactivité *L* / Radioactivité *O*
	radio-activité	%	radio-activité	%	
Ensemble des limbes	390 000		670 000		
Protéines holochromes des plastes	7 000	1,8 %	50 000	7,5 %	
Protéines cytoplasmiques	4 100	1 %	19 000	2,8 %	
Substances liposolubles	231 600	59 %	295 000	44 %	1,3
Surnageant S_3 déprotéinisé	147 300	38,2 %	306 000	45,7 %	

Le rapport $\frac{\text{radioactivité } L}{\text{radioactivité } O}$ est de 1,3 pour la fraction correspondant aux substances liposolubles. Il est du même ordre de grandeur que celui trouvé lors des

expériences avec le ^{35}S, la cystéine ^{35}S et le glycocolle. Il reflète une activité métabolique plus importante à la lumière chez les jeunes plantes vertes. Avec l'acide δ-amino-lévulique ce rapport n'a pas été calculé pour les protéines, car leur radioactivité provient en partie de porphyrines adsorbées. Si l'on traite les fractions protéiques par le mélange méthanol-sulfurique (20-1 v/v) pendant 48 h à 4 °C, après addition de 2 volumes de chloroforme et formation de deux phases par apport d'eau, on observe une radioactivité importante dans la phase chloroformique où se trouvent les porphyrines. Après ce traitement de la radioactivité reste cependant liée aux protéines.

Dans toutes les expériences faites avec l'acide δ-amino-lévulique la chlorophylle *a* et la chlorophylle *b* ont la même radioactivité spécifique. Le précurseur de la chlorophylle *b* est donc ou bien identique à celui de la chlorophylle *a*, ou bien la chlorophylle *a* elle-même.

L'intégration de l'acide δ-amino-lévulique dans les proplastes des limbes étiolés est très rapide. Il suffit de laisser les bases des feuilles pendant 3 h dans une solution d'acide, puis 1 h sur de l'eau distillée, toujours à l'obscurité, pour obtenir dans les limbes la répartition de la radioactivité indiquée dans le tableau XVI.

TABLEAU XVI

Répartition de la radioactivité provenant de l'acide δ-amino-lévulique dans des limbes étiolés après une courte période d'incorporation

Radioactivité spécifique de l'acide δ-amino-lévulique 4 mCi/mM. Durée de l'incorporation 3 h.

Fractions analysées	Limbes étiolés	
	Radioactivité en i.p.m.	% de la radioactivité totale des limbes
Ensemble des limbes	1 180 000	
Protéines holochromes des plastes	160 000	14 %
Protéines cytoplasmiques	84 000	7 %
Substances liposolubles	392 000	33 %
Surnageant S_3 déprotéinisé	544 000	46 %

Dans les expériences précédentes, l'analyse des composés marqués de la fraction des *substances liposolubles* n'a pas été faite. Ces composés solubles dans l'éther éthylique pur peuvent comprendre la protochlorophylle et la protoporphyrine. GRANICK (1959) a observé ces derniers composés dans des plantes d'Orge étiolées incorporant pendant une nuit une solution d'acide δ-amino-lévulique.

VIRGIN (1961) signale que la synthèse de la protochlorophylle s'effectue tant que la feuille étiolée croît. Elle cesse dès que celle-ci a atteint sa taille normale. L'intégration de l'acide δ-amino-lévulique dans les limbes étiolés, comme celle des autres acides aminés, peut être due principalement à des phénomènes de croissance.

Il semble, d'après les expériences faites avec l'acide δ-amino-lévulique que les proplastes possèdent les matériaux nécessaires à la synthèse des chlorophylles. En effet on ne constate pas une différence importante d'intégration de cet acide dans les proplastes à l'obscurité et dans les plastes en cours de verdissement.

L'observation faite sur la formation du noyau tétrapyrrolique conduit à doser le magnésium dans les proplastes et dans les chloroplastes. Le dosage effectué par la méthode colorimétrique utilisant le jaune thiazol (*in* PEACH et TRACEY, 1955) montre que le magnésium contenu dans les chloroplastes provient des chlorophylles. Ce métal n'existe pas ou peu dans les proplastes. Si ces derniers possèdent les précurseurs du noyau tétrapyrrolique, ils ne possèdent par contre que des traces de magnésium, et l'apport de ce métal est nécessaire pour la synthèse des chlorophylles.

Zone de protéosynthèse intense et de formation des plastes

La base des limbes est le lieu d'une protéosynthèse intense et d'une formation active de plastes. GRANICK (1959) a observé, chez des plantes étiolées alimentées en acide δ-amino-lévulique, une accumulation de protoporphyrine dans le cytoplasme des cellules de cette zone.

L'incorporation des acides aminés dans les protéines des plastes et du cytoplasme a été étudiée dans la moitié apicale du limbe (zone de protéosynthèse lente) et dans la moitié basale (zone de protéosynthèse intense).

L'expérience est effectuée à l'aide de plantules de Maïs de 12 à 13 jours, comprenant 4 feuilles. Deux lots identiques, formés chacun des parties aériennes de 25 plantes, sont préparés pour être placés, l'un à la lumière, l'autre à l'obscurité. Ils sont plongés par leur base dans des solutions aqueuses d'acides aminés uniformément marqués au ^{14}C, provenant d'un hydrolysat de protéines de Chlorelles et possédant une radioactivité spécifique moyenne de 150 μCi/mg. Les solutions utilisées ont une radioactivité de 10 μCi/ml. Les parties aériennes sont laissées sur cette solution durant 9 h puis ensuite transportées sur eau distillée où elles restent pendant 14 h. Les analyses se font sur les moitiés basales et apicales des limbes des 2^e et 3^e feuilles. Pour les limbes étiolés ou verdis, les quantités de matériel utilisé sont représentées par les surfaces suivantes :

Parties basales des limbes étiolés	190 cm^2
Parties apicales des limbes étiolés	208 cm^2
Parties basales des limbes verdis	182 cm^2
Parties apicales des limbes verdis	195 cm^2

TABLEAU XVII

Répartition de la radioactivité, provenant d'un hydrolysat de protéines ^{14}C de Chlorelles, dans des fractions de limbes étiolés soumis à 23 h de lumière

Radioactivité spécifique moyenne de l'hydrolysat de protéines de Chlorelles 150 μCi/mg. Radioactivité totale des fractions de limbes 4,5 $\times$ 10^5 i.p.m. Résultats exprimés en % par rapport à la radioactivité présente dans les fractions de limbes.

Fractions analysées	Parties basales des limbes	Parties apicales des limbes
Protéines holochromes des plastes	23,5 %	12,6 %
Protéines cytoplasmiques	13,3 %	10,5 %
Substances liposolubles.....	11,5 %	7,3 %
Surnageant S_3 déprotéinisé	51,7 %	69,6 %

La chlorophylle synthétisée pendant l'expérience correspond à 25 % du taux normal pour la partie basale des limbes verdis et à 20 % pour la région apicale.

La répartition de la radioactivité des différents constituants analysés est indiquée dans les tableaux XVII et XVIII.

TABLEAU XVIII

Répartition de la radioactivité, provenant d'un hydrolysat de protéines ^{14}C de Chlorelles, dans des fractions de limbes étiolés laissés 23 h à l'obscurité.

Radioactivité spécifique de l'hydrolysat de protéines de Chlorelles 150μ Ci/mg. Radioactivité totale des fractions de limbes 4,5 × 10^5 i.p.m. Résultats exprimés en % par rapport à la radioactivité présente dans les fractions de limbes.

Fractions analysées	Parties basales des limbes	Parties apicales des limbes
Protéines holochromes des plastes	6 %	4 %
Protéines cytoplasmiques	4 %	3 %
Substances liposolubles	3 %	2 %
Surnageant S_3 déprotéinisé	87 %	90 %

Les parties basales des feuilles montrent une protéosynthèse plus importante que les parties apicales. Cette observation est à rapprocher des résultats obtenus par PEARSALL et BILLIMORIA (1938, 1939). Ces auteurs ont montré, avec des feuilles détachées de Narcisse, que la synthèse protéique ne se manifeste que dans les segments foliaires les plus jeunes. Pour les feuilles de Graminées, la zone méristématique très étroite, limitée à la partie voisine de la ligule est la région de croissance protoplasmique active.

La répartition de la radioactivité dans les limbes étiolés et dans les limbes verdis peut être obtenue à partir des résultats exprimés dans les tableaux XVII et XVIII. La répartition de l'incorporation entre les différentes fractions est semblable chez les limbes étiolés soumis à la lumière ou à l'obscurité, ce qui confirme les résultats obtenus avec le $^{35}SO_4^{--}$, la cystéine ou le glycocolle (tableau XIX).

Pour rendre plus sensibles les différences d'incorporation observées entre parties basales et parties apicales des limbes étiolés laissés à l'obscurité, des organes plus jeunes ont été également utilisés. Les plantes ont trois feuilles, la troisième pointant. Les autres conditions expérimentales sont semblables aux précédentes. Seules les 2e feuilles sont prélevées et analysées. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau XX.

La protéosynthèse est importante dans la partie basale des limbes même lorsqu'ils restent étiolés.

Tableau XIX

Répartition de la radioactivité provenant d'un hydrolysat de protéines ^{14}C de Chlorelles, dans des limbes étiolés soumis à 23 h de lumière (L), ou à 23 h d'obscurité (O)

Radioactivité spécifique de l'hydrolysat de protéines de Chlorelles : 150 μCi/mg. Radioactivité totale des limbes : 9×10^5 i.p.m. Résultats exprimés en % de la radioactivité totale des limbes.

Fractions analysées	Limbes *L*	Limbes *O*	$\frac{\text{Radioactivité } L}{\text{Radioactivité } O}$
Protéines holochromes des plastes	18 %	5,5 %	3,3
Protéines cytoplasmiques	11,9 %	3,4 %	3,5
Substances liposolubles	9,5 %	2,7 %	3,5
Surnageant S_3 déprotéinisé	60,6 %	88,4 %	

Tableau XX

Répartition de la radioactivité, provenant d'un hydrolysat de protéines ^{14}C de Chlorelles, dans des fractions de jeunes limbes étiolés laissés 23 h à l'obscurité

Radioactivité spécifique de l'hydrolysat de protéines de Chlorelles 150 μCi/mg. Radioactivité totale des fractions de limbes 5×10^5 i.p.m. Résultats exprimés en % par rapport à la radioactivité présente dans les fractions de limbes.

Fractions analysées	Parties basales des limbes	Parties apicales des limbes
Protéines holochromes des plastes	33 %	12,8 %
Protéines cytoplasmiques	7 %	4,3 %
Substances liposolubles	1 %	0,5 %
Surnageant S_3 déprotéinisé	59 %	82,4 %

Croissance des plastes

Mego et Jagendorf (1961) ont étudié l'effet des éclairs lumineux sur la croissance des proplastes. Si des plantules de Maïs ne reçoivent de la lumière à aucun moment de leur développement elles conservent des plastes petits, très inférieurs en taille aux chloroplastes. Il suffit que les plantes reçoivent de la lumière rouge ou blanche pendant de brefs instants pour induire un développement normal des plastes sans synthèse nette de chlorophylle.

Comparativement des plantules de Maïs âgées de 9 à 10 jours, développées complètement à l'obscurité et des plantules de même âge soumises à de la lumière pendant de courts instants (lumière blanche, 2 000 à 3 000 lux, 5 mn par 24 h) ont été étudiées. La quantité totale de *protéines holochromes* des plastes est mesurée et exprimée par rapport à l'unité de surface des limbes. Dans les deux cas, la teneur en azote est voisine de 1,7 mg/dm^2.

Si de brefs éclairs lumineux modifient la forme des plastes comme le constatent MEGO et JAGENDORF, ils n'ont guère d'action sur la quantité totale des protéines holochromes ce qui n'exclut pas une modification de la nature de ces substances.

Comparaison des compositions en acides aminés des protéines holochromes des chloroplastes et des proplastes

Si les proplastes possèdent le matériel nécessaire à la formation des protéines des chloroplastes, la composition en acides aminés de leurs protéines doit être très voisine. Les plastes ont été isolés comme il a été décrit précédemment et lavés deux fois dans une solution de NaCl 0,35 M. Après extraction des pigments et des lipides par le mélange éther-alcool, les protéines subissent une hydrolyse, en présence de HCl 6N, en tube scellé sous vide, à 110 °C pendant 18 h. Les acides aminés sont analysés par la méthode de STEIN et MOORE (1951). D'une analyse à l'autre, les écarts observés dans les dosages n'ont pas dépassé 10 %.

La composition des protéines totales en acides aminés est exprimée de 2 manières différentes :

1° par le rapport $\frac{\text{sérine}}{\text{acide aminé}}$. La destruction de certains acides aminés pendant l'hydrolyse acide n'entraîne pas d'erreurs dans les résultats relatifs aux acides aminés stables à l'hydrolyse.

2° par les pourcentages. Dans ce cas, les pertes dues à certains acides aminés affectent l'ensemble des résultats.

TABLEAU XXI

Composition en acides aminés des protéines holochromes des chloroplastes et des proplastes de Maïs.

Acides aminés	Rapport $\frac{\text{sérine}}{\text{acide aminé}}$		% de l'acide aminé dans les protéines	
	Proplastes	Chloroplastes	Proplastes	Chloroplastes
Alanine	0,562	0,558	10,66	12,27
Arginine	1,29	1,42	4,58	4,19
Acide aspartique	0,699	0,673	8,61	8,519
Acide glutamique	0,618	0,599	9,87	9,59
Glycine	0,617	0,547	9,86	10,49
Histidine	3,41	3,278	1,78	1,80
Isoleucine	1,034	1,01	5,82	5,67
Leucine	0,58	0,516	10,37	11,08
Lysine	0,95	1,15	6,46	5,23
Phénylalanine	1,247	1,003	4,53	5,73
Proline	1,137	0,966	5,28	5,94
Sérine	1,00	1,00	6,12	5,74
Thréonine	1,17	1,12	5,24	5,09
Tyrosine	2,396	2,346	2,17	2,55
Valine	0,784	0,826	7,62	6,94

Les compositions en acides aminés des *protéines holochromes* des proplastes et des chloroplastes figurent dans le tableau XXI. Elles proviennent de moyennes de quatre analyses dont les écarts ne dépassent pas 10 %.

Les teneurs en acides aminés des *protéines holochromes* totales des chloroplastes et des proplastes présentent de grandes similitudes. Seules la lysine et la phénylalanine montrent des différences significatives de 20 à 23 %. L'incorporation de ces deux acides aminés dans des limbes étiolés placés soit à la lumière, soit à l'obscurité, pourrait donc être différente de celle du glycocolle et de la cystéine. Aussi a-t-elle été étudiée pour la lysine.

Incorporation de la lysine ^{14}C pendant le verdissement

Le protocole expérimental utilisé est celui des expériences réalisées avec la cystéine ^{35}S et le glycocolle ^{14}C. La *dl*-lysine est marquée sur l'atome de carbone 6. Sa radioactivité spécifique est de 2,4 mCi/mM. Les bases, des parties aériennes de Maïs étiolés, sont placées dans une solution contenant 20 μCi de lysine ^{14}C. Au cours de l'expérience, le lot exposé à la lumière a synthétisé 2 mg de chlorophylle. Le tableau XXII donne la répartition de la radioactivité des différentes fractions isolées, exprimée par rapport à la radioactivité incorporée dans les limbes analysés. La radioactivité incorporée correspond à environ 60 μg de lysine.

TABLEAU XXII

Répartition de la radioactivité provenant de la lysine 6 ^{14}C, dans des limbes étiolés soumis à 24 h de lumière continue (L) ou à 24 h d'obscurité (O)

Radioactivité spécifique de la lysine : 2,4 mCi/mM. Radioactivité exprimée en i.p.m. et en % de la radioactivité totale des limbes.

Fractions analysées	Limbes *L*		Limbes *O*		Radioactivité *L* / Radioactivité *O*
	Radio-activité	%	Radio-activité	%	
Ensemble des limbes	500 000		690 000		
Protéines holochromes des plastes	42 500	8,5	35 000	5,1	1,67
Protéines cytoplasmiques	34 000	6,8	29 000	4,2	1,6
Surnageant S_3 déprotéinisé	423 500	84,7	626 000	90,7	

Bien que les teneurs en lysine des protéines holochromes des plastes jaunes et des chloroplastes soient différentes de 20 %, la radioactivité se répartit entre les plastes et le cytoplasme d'une manière semblable à la lumière et à l'obscurité. Les résultats sont comparables à ceux obtenus avec la cystéine, le glycocolle ou le mélange d'acides aminés.

Incorporation des acides aminés dans les protéines des plastes isolés

STEPHENSON, THIMANN et ZAMECNICK (1956) ont montré que les chloroplastes isolés de feuilles de Tabac incorporent dans leurs protéines des acides aminés. La présence des enzymes d'activation des acides aminés a été démontrée par BOVÉ et RAACKE (1959). HEBER (1962) a constaté un marquage des protéines des chloroplastes isolés d'Epinard à partir du $^{14}CO_2$. BRAWERMAN (1962) a isolé des ribosomes spécifiques de chloroplastes d'Euglènes. Ces résultats confirment le fait que ces organites sont capables d'effectuer la synthèse de leurs propres protéines.

Les proplastes possèdent-ils cette propriété ? Pour répondre à cette question, l'incorporation d'acides aminés dans les protéines des proplastes a été étudiée. Les proplastes sont obtenus de la façon suivante :

— broyage des limbes au mortier, à 4 °C, en présence d'une solution de NaCl 0,35 M
— passage sur étamine
— centrifugation pendant 1 minute à 1 000 g
— centrifugation du surnageant précédent à 1 000 g pendant 20 minutes.

Le dernier culot, remis en suspension dans du NaCl 0,35 M, fournit le matériel expérimental.

Les plastes sont préparés immédiatement avant chaque expérience. Ils sont placés dans les deux milieux réactionnels suivants dont l'efficacité a été comparée.

(1) — 3 µl solution acides aminés (hydrolysat de protéines de Chlorelles 630 µCi/mg). Solution à 0,5 mCi/ml.
— 100 µl de tampon tris pH 7,4, 0,2 M.
— plastes 0,2 à 0,8 mg de protéines.
Volume final : 0,2 ml.

(2) Milieu utilisé pour la synthèse protéique par les ribosomes (CHAPEVILLE F., LIPMANN F., VON EHRENSTEIN G., WEISBLUM B., RAY W.J. et BENZER S., 1962).

	Concentration	Quantité utilisée
ATP	0,1 M	40 µl
Phosphoénolpyruvate	0,05 M	200 µl
Phosphoénolpyruvate kinase	1 mg/ml	4 µl
GTP	0,05 M	20 µl
GSH	0,2 M	100 µl
Tampon phosphate pH 7,35	0,25 M	100 µl
KCl	1,00 M	8 µl
Acides aminés marqués :		
(hydrolysat de protéines	630 µCi/mg	3 µl
de Chlorelles)	0,5 mCi/ml	
Plastes	0,2 à 0,8 mg	

L'incorporation a lieu à 37 °C pendant 90 minutes. Dans les conditions utilisées, la lumière ne semble pas avoir d'action. Les réactions sont arrêtées par addition d'acide trichloracétique à 10 %. La suspension est aussitôt portée à 70 °C pendant 10 minutes, centrifugée à 10 000 g pendant 15 minutes et le surnageant est écarté. Le culot est lavé trois fois dans une solution d'acide trichloracétique à 10 % contenant un mélange d'acides aminés non marqués qui servent d'entraîneurs. Puis il est délipidifié par un mélange éther-alcool v/v. Les protéines sont enfin dissoutes dans l'acide formique pur pour être déposées dans des coupelles afin de mesurer la radioactivité incorporée. Les protéines peuvent être soumises non seulement à l'action de l'acide trichloracétique mais aussi à celle de l'acide performique fraîchement préparé. Ce dernier acide permet, par lavage, d'éliminer les acides aminés qui ne seraient

pas engagés dans des liaisons peptidiques. Ce traitement ne modifie pas la radioactivité des protéines. Tous les acides aminés retrouvés sont bien liés par des liaisons peptidiques.

Le tableau XXIII indique les résultats obtenus pour les proplastes et pour les chloroplastes avec le milieu (1).

Tableau XXIII

Incorporation des acides aminés ^{14}C provenant d'un hydrolysat de protéines, dans les protéines de plastes isolés.

Durée d'incorporation : 90 mn. Température 37 °C. Milieu (1). Les indices indiquent le nombre d'expériences correspondant aux moyennes indiquées.
Radioactivité spécifique de l'hydrolysat 630 μCi/mg.

Matériel	Activité incorporée exprimée en i.p.m/mg protéines
Plastes verts[6]	4 500
Plastes jaunes[6]	290 000
Plastes jaunes[1]	30 000
Plastes jaunes[1]	125 000

L'incorporation des acides aminés dans les protéines est plus importante dans les plastes jaunes que dans les plastes verts.

Les deux milieux réactionnels utilisés donnant des résultats sensiblement identiques, aussi le premier a-t-il été retenu pour la suite des expériences.

Il est nécessaire que les plastes soient utilisés dès leur préparation. Ils perdent en effet rapidement leur activité de protéosynthèse. En 2 h elle diminue de 30 à 40 %. Cette diminution est ralentie si les plastes sont mis en suspension dans une solution de NaCl à 9 ‰ contenant 10 % de glycérol.

L'incorporation des acides aminés dans les protéines est sensiblement la même, que les plastes soient lavés ou non.

Action des inhibiteurs de la protéogenèse

Le chloramphénicol, la puromycine et l'auréomycine ont été testés à la concentration de 10^{-4} M. Le volume total du milieu utilisé est de 0,5 ml et contient 0,3 mg de protéines. Les résultats obtenus figurent dans le tableau XXIV.

Tableau XXIV

Action des inhibiteurs de la protéogenèse sur l'incorporation des acides aminés ^{14}C dans les protéines des proplastes isolés

Radioactivité spécifique de l'hydrolysat 630 μCi/mg. Radioactivité incorporée par le témoin $2,5 \times 10^5$ i.p.m./mg de protéines.

Inhibiteur	Pourcentage d'inhibition
Chloramphénicol	100 %
Puromycine	60 à 70 %
Auréomycine	90 à 100 %

Ces résultats montrent que la synthèse protéique peut s'effectuer *in vitro* dans les proplastes isolés. Elle peut avoir lieu déjà d'une manière sensible, comme pour les

chloroplastes, sans apport d'énergie extérieure. L'énergie nécessaire à une synthèse protéique décelable se trouve présente dans les plastes.

ETUDE DE QUELQUES PROPRIÉTÉS DES PROTÉINES SYNTHÉTISÉES PAR LES PROPLASTES

Solubilité

Afin de voir si les protéines synthétisées par les proplastes sont solubles ou non dans une solution aqueuse de NaCl 0,35 M, deux expériences identiques d'incorporation sont faites en présence d'acides aminés marqués. Après 90 mn à 37 °C, les proplastes sont traités par la technique déjà décrite dans une expérience. Dans l'autre, ils sont lavés trois fois avec une solution de NaCl 0,35 M (10 volumes par volume de suspension) avant la mesure. La radioactivité retrouvée dans les protéines est semblable dans les deux cas. Elle appartient à l'ensemble des protéines liées aux pigments.

Propriétés électrophorétiques

Extraction des protéines par le SDS

Après incubation en présence des acides aminés ^{14}C provenant d'un hydrolysat de protéines de Chlorelles, les proplastes sont lavés trois fois avec une solution de NaCl 0,35 M (10 volumes de solution par volume de suspension). Ensuite les protéines des proplastes sont extraites à l'aide d'une solution de SDS à 0,2 %. Après centrifugation, il ne reste plus de protéines ni de pigments dans le culot. Le surnageant jaune est soumis à l'électrophorèse selon la technique de BACON et CLENDENNING (1956) décrite page 000. L'autoradiographie montre que la radioactivité est localisée en une seule tache dont la position correspond à celle des pigments et des protéines (fig. 10).

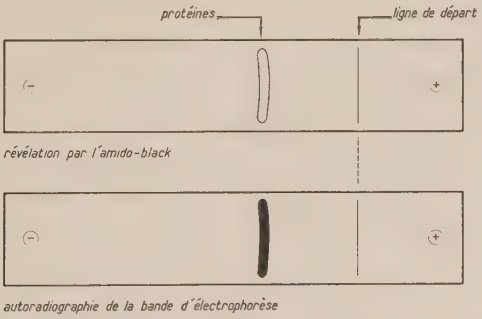


FIG. 10. — Electrophorèse sur papier des protéines des proplastes extraites par le SDS, après incorporation d'acides aminés ^{14}C. Solution d'électrophorèse : SDS à 0,2 %, dans du tampon borate 0,1 M, pH 8,9 ; température 4 °C ; tension 300 V, durée 2 h.

Extraction des protéines par l'acide formique

Les proplastes, après incorporation des acides aminés ^{14}C, sont traités par l'acide trichloracétique à 10 % (2 ml pour 0,5 ml de suspension), à chaud, puis lavés trois fois avec la même solution en présence d'acides aminés non radioactifs qui servent d'entraîneurs. Un dernier traitement par une solution éthéro-alcoolique, suivi d'une centrifugation, donne un culot qui est repris par l'acide formique. Après une nuit de contact et une centrifugation, on obtient un surnageant qui comprend les protéines. Une électrophorèse sur papier est faite avec comme phase liquide de l'acide formique

pur. L'opération est effectuée sous hotte dans les conditions suivantes : $T = 15$ °C, tension 400 V, durée 4 h. Après séchage du papier, les protéines sont révélées par l'amido-black et la radioactivité par autoradiographie. Les protéines sont groupées en une seule tache. Elles se sont déplacées vers le pôle négatif.

La radioactivité est également localisée en une seule bande qui correspond à l'emplacement des protéines (fig. 11).

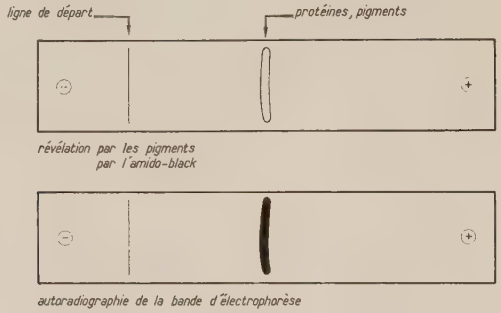


FIG. 11. — Electrophorèse sur papier des protéines des proplastes extraites par l'acide formique, après incorporation d'acides aminés ^{14}C. Phase liquide : acide formique pur. Tension 400 V, température 15 °C ; durée 4 h.

Les protéines synthétisées par les proplastes isolés sont insolubles dans l'eau et dans les solutions de NaCl 0,35 M. Par électrophorèse on ne les sépare pas des protéines liées aux pigments. Par cette technique, après extraction au SDS ou après solubilisation dans l'acide formique, on obtient une seule bande de protéines.

Analyse des acides nucléiques des chloroplastes et des proplastes

L'extraction des acides nucléiques est faite selon la technique de BRAWERMAN, POGO et CHARGAFF (1962). Dans ces conditions on n'observe pas de différence significative des quantités d'ARN entre les proplastes et les chloroplastes, ce qu'indiquent les résultats exprimés dans le tableau XXV.

TABLEAU XXV

*Quantités d'ARN en µg par mg d'*N *protéique*
Coefficient d'extinction molaire à 260 mµ = 10 000.

Chloroplastes	Proplastes
320	330

Dans certaines analyses, les quantités d'ARN trouvées sont nettement inférieures, mais restent très voisines dans les chloroplastes et les proplastes.

La composition en nucléotides des ARN des plastes jaunes et verts n'a pas été déterminée. BRAWERMAN et CHARGAFF (1959*b*), avec les cellules d'*Euglena Gracilis* vertes et étiolées ont constaté de petites différences dans la distribution des nucléo-

tides. Les organismes verts ont une proportion supérieure d'acides adénylique et uridylique et une proportion inférieure d'acides cytidylique et guanylique.

Les dosages d'ADN effectués ne permettent pas de dire s'il est décelable ou non dans les plastes. Les mesures d'absorption en ultraviolet utilisées n'ont pas été contrôlées par la technique de coloration à la diphénylamine. Les absorptions obtenues sont très faibles, ce qui ne permet pas de leur donner un sens.

Discussion

Les expériences précédentes montrent que le verdissement des plantules étiolées n'entraîne pas une augmentation nette de la masse des protéines des plastes par unité de surface. La répartition des acides aminés marqués incorporés est la même dans les limbes étiolés et dans les limbes verts. La lumière intervient seulement en provoquant la synthèse des pigments et en activant le métabolisme des plantes. L'augmentation de l'incorporation des acides aminés dans les protéines du cytoplasme et des plastes, de l'acide δ-amino-lévulique dans le noyau tétrapyrrolique, peut s'expliquer par une croissance plus rapide des feuilles en présence de la lumière. Les résultats obtenus montrent que les proplastes possèdent le stock de protéines, d'ARN et de précurseurs des chlorophylles, nécessaires à l'édification du chloroplaste.

De nombreux auteurs associent, par contre, une synthèse concomitante de protéines à l'apparition de la chlorophylle et à la formation des lamelles et granums. De Deken-Grenson (1954) avec la Chicorée, Brawerman, Pogo et Chargaff (1962) avec *Euglena gracilis* constatent une augmentation de 40 % de la quantité de protéines des plastes après une exposition des végétaux à la lumière pendant 48 h.

Cette divergence peut s'expliquer par la différence des techniques utilisées. Les observations faites sur le comportement, à la centrifugation, des homogénats de limbes verdis et de limbes étiolés, ont montré que les chloroplastes se sédimentent plus facilement que les proplastes. De Deken-Grenson compare les quantités d'N de culots obtenus par la centrifugation, dans les mêmes conditions, de broyats provenant de masses identiques de limbes verts et étiolés. Le rapport de ces quantités d'N correspond, d'après cet auteur, à celui des protéines des plastes dans les deux types de limbes. Cette interprétation serait exacte si chloroplastes et proplastes se sédimentaient de la même façon.

De Deken-Grenson (1955) constate que la streptomycine n'inhibe pas le verdissement de plantes étiolées alors que la synthèse de la chlorophylle est supprimée dans les zones de croissance des feuilles. Cette observation s'explique si le verdissement ne s'accompagne pas d'une synthèse concomitante de protéines des plastes. On sait en effet que la streptomycine a la propriété de former des complexes insolubles avec l'ARN (Cohen, 1946) bloquant ainsi la synthèse protéique. Cet antibiotique n'agit pas sur les proplastes des plantes étiolées, ceux-ci possédant le stock de protéines nécessaire à la formation des lamelles et granums.

La dihydrostreptomycine et l'acide 3-(α-iminoéthyl)-5 méthyltétronique (Signol, 1961*a*, *b*), la streptomycine (Lefort, 1963) ont également des propriétés « anti-chlorophylliennes ». Ces substances inhibent seulement la formation des lamelles et des granums chez les plastes en croissance. Les plastes modifiés ne possèdent que des vésicules et un stroma lâche. Ils ont toujours une taille voisine des plastes normaux et une double membrane. Une action sur la synthèse protéique au niveau de l'ARN des plastes est vraisemblable. La dihydrostreptomycine et l'acide 3-(α-iminoéthyl)-5 méthyltétronique ne provoquent aucune modification structurale des plastes déjà différenciés. Ils n'agissent pas sur les protéines existantes.

Brawerman et Chargaff observent, avec des Euglènes étiolées, une synthèse

importante de protéines dans les proplastes au cours du verdissement. Ce résultat est différent de celui observé avec le Maïs. EPSTEIN, BOY de la TOUR et SCHIFF (1960) signalent, chez les Euglènes cultivées à l'obscurité, une disparition de la chlorophylle et une régression des plastes. Les plantes supérieures ne présentent pratiquement pas de régression comparable. La lumière provoque chez les Euglènes étiolées, non seulement la synthèse de la chlorophylle, mais aussi le développement des plastes (BEN SHAUL, SCHIFF et EPSTEIN, 1964).

CONCLUSIONS

Deux voies différentes d'investigation ont été suivies pour l'étude de la structure des chloroplastes. L'une, utilisant les détergents, renseigne surtout sur les liaisons existant entre les différents constituants des plastes. L'autre, consistant à observer les modifications biochimiques dues au verdissement, permet de connaître l'ordre dans lequel s'imbriquent ces constituants.

Avec une quantité de SDS de 10 mg par mg de chlorophylle, les chloroplastes sont dispersés en milieu aqueux sans rupture des liaisons entre les phospholipides, les pigments et les protéines. Seuls les acides nucléiques et les nucléotides se détachent. L'électrophorèse, la précipitation par le sulfate d'ammonium ne permettent pas de séparer différents complexes chromoprotéiques. Une quantité plus faible de SDS, 3 mg par mg de chlorophylle, permet par contre une dispersion partielle des plastes et sépare un complexe dont le maximum d'absorption dans le rouge est à 680 mμ. La dispersion complète est provoquée par 10 mg de SDS par mg de chlorophylle. Le complexe obtenu a son maximum d'absorption à 670 mμ et sa composition biochimique diffère du précédent par le rapport $\frac{\text{chlorophylle } a}{\text{chlorophylle } b}$, les teneurs en xanthophylles et en protéines.

Le Tween 20 provoque non seulement la rupture des liaisons entre protéines et pigments mais également une séparation des phospholipides et des protéines. Cette action du Tween 20 est à rapprocher de celle du désoxycholate étudiée par SMITH (1941) et qui rompt également les liaisons entre protéines et pigments. Le désoxycholate forme des complexes solubles en milieu aqueux avec les lipides. Il est possible que ces derniers constituent le ciment qui relie chlorophylles et protéines.

L'étude des modifications biochimiques provoquées par le verdissement permet de montrer que les proplastes contiennent l'N protéique, les précurseurs du noyau tétrapyrrolique et l'ARN nécessaires à la formation des chloroplastes. La lumière modifie la structure des proplastes en utilisant en majeure partie les matériaux déjà en place.

Avec l'apparition des chlorophylles se différencient les lamelles et les granums caractéristiques des chloroplastes. Ces modifications dans la structure entraînent-elles un remaniement profond des protéines ? Une analyse de la structure primaire de ces dernières chez les proplastes et les chloroplastes pourra peut-être apporter une réponse à cette question.

Les proplastes jaunes isolés de feuilles étiolées gardent une forte activité de protéosynthèse. Ils incorporent *in vitro* les acides aminés dans des protéines qui ne peuvent être séparées des protéines holochromes. De telles études d'incorporation permettent sans doute de comprendre le mécanisme de la protéogenèse dans les plastes, indépendamment même de la chlorophyllogenèse.

REMERCIEMENTS

Au moment où cette thèse va être soutenue, j'exprime ma vive reconnaissance au Professeur J. Coursaget, Chef du Département de Biologie, pour l'accueil qu'il m'a réservé et pour la grande liberté qu'il m'a accordée. Ma gratitude va de même à Monsieur Roux auprès de qui j'ai pu effectuer ce travail.

Qu'il me soit permis d'exprimer ma gratitude aux Professeurs P. Chouard, A. Moyse et J. Lavorel pour l'honneur qu'ils m'ont fait en voulant bien examiner ce travail et en acceptant de faire partie du Jury.

Je tiens à remercier Monsieur F. Chapeville pour ses utiles suggestions et critiques au cours de ce travail.

Je dois beaucoup à Mademoiselle G. Guignery qui a été pour moi une précieuse collaboratrice.

BIBLIOGRAPHIE

Allen M.B., Murchio J.C., Jeffrey S.W. et Bendix S.A., 1963 – *Microalgae and photosynthetic Bacteria*, Univ. Tokyo Press, 407-412.

Arnon D.I., 1961 – Celle-free photosynthesis and the energy conversion process in *A symposium on Light and Life*, W.D. Mc Elroy et B. Glass éd., Johns Hopkins Press, Baltimore, 489-569.

Bacon K.E. et Clendenning K.A., 1956 – Properties of chloroplast dispersion in the presence of detergent. *Biochim. Biophys. Acta*, **19**, 75-83.

Bannister T.T., 1963 – Les propriétés physiques et photochimiques de la chlorophylle colloïdale. *Physiol. Vég.*, **1**, 115-127.

Benson A.A. et Maruo B., 1958 – Plant Phospholipids. I - Identification of the phosphatidyls glycerols. *Biochim. Biophys. Acta*, **27**, 189-195.

Benson A.A. et Strickland E.H., 1960 – Plant Phospholipids. III - Identification of diphosphatidyl glycerol. *Biochim. Biophys. Acta*, **41**, 328-333.

Bier M., 1959 – *Electrophoresis. Theory, methods and applications.* Acad. Press, New York, 200-208

Bové J. et Raacke I.D., 1959 – Amino acid activating enzymes in isolated chloroplasts from spinach Leaves. *Arch. Biochem. Biophys.*, **85**, 521-531.

Brawerman G. et Chargaff E., 1959 *a* – Changes in protein and ribonucleic acid during the formation of chloroplasts in *Euglena gracilis*. *Biochim. Biophys. Acta*, **31**, 164-171.

Brawerman G. et Chargaff E., 1959 *b* – Relation of ribonucleic acid to the photosynthetic apparatus in *Euglena gracilis*. *Biochim. Biophys. Acta*, **31**, 172-177.

Brawerman G. et Chargaff E., 1959 *c* – Factors involved in the development of chloroplasts in *Euglena gracilis*. *Biochim. Biophys. Acta*, **31**, 178-186.

Brawerman G., Pogo A.O. et Chargaff E., 1962 – Induced formation of ribonucleic acids and plastid protein in *Euglena gracilis* under the influence of light. *Biochim. Biophys. Acta*, **55**, 326-334.

Brawerman G., 1962 – A specific species of ribosomes associated with the chloroplasts of *Euglena gracilis*. *Biochim. Biophys. Acta*, **61**, 313-315.

Bril C., 1958 – Action of a non-ionic detergent on chromatophores of *Rhodopseudomonas spheroides*. *Biochim. Biophys. Acta*, **29**, 458.

Bril C., 1960 – Studies on bacterial chromatophores. I - Reversible disturbance of transfer of electronic excitation energy between bacteriochlorophyll-types in *Chromatium*. *Biochim. Biophys. Acta*, **39**, 296-303.

Brown J.S. et French C.S., 1959 – Absorption spectra and relative photostability of the different forms of chlorophyll in *Chlorella*. *Plant Physiol.*, **34**, 305-309.

Brown J.S., 1963 – Forms of chlorophyll *a*. *Photochem. and Photobiol.*, Pergamon Press Ltd., **2**, 159-173.

Brown J.S. et Duranton J.G., 1964 – Partial separation of the forms of chlorophyll *a* by sodium dodecylsulfate. *Biochim. Biophys. Acta*, **79**, 209-211.

Chapeville F., Lipmann F., Von Ehrenstein G., Weisblum B., Ray W.J. et Benzer S., 1962 – On the role of soluble ribonucleic acid in coding for amino acids. *Proc. nation. Acad. Sci. U.S.A.*, **48**, 1086-1092.

Cohen S.S., 1946 – Streptomycin and desoxyribonuclease in the study of variations in the properties of a bacterial virus. *J. biol. Chem.*, **166**, 393-394.

Dawson R.M.C., 1954 – The measurement of ^{32}P labelling of individual kephalins and lecithin in a small sample of tissue. *Biochim. Biophys. Acta*, **14**, 374-379.

De Deken-Grenson M., 1954 – Grana formation and synthesis of chloroplastic proteins induced by light in portions of etiolated leaves. *Biochim. Biophys. Acta*, **14**, 203-211.

De Deken-Grenson M., 1955 – Action de la streptomycine sur la formation des chloroplastes. *Biochim. Biophys. Acta*, **17**, 35-47.

Dumazert C. et Marcelet Y., 1938 – Sur un nouveau catalyseur de minéralisation en vue du dosage de l'azote par la méthode de Kjeldahl. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **20**, 201-212.

Duysens L.N.M., 1961 – Cytochrome oxidation by a second photochemical system in the red alga *Porphyridium cruentum* in *Progress in Photobiology*. Elsevier Publishing Co 135-142.

Ferrari R.A. et Benson A.A., 1961 – The path of carbon in photosynthesis of the lipids. *Arch. Biochem. Biophys.*, **93**, 185-192.

Goodwin T.W., 1959 – The biosynthesis and function of the carotenoid pigments. *Advances in Enzymology*, Ed. Interscience Publ. Inc., **21**, 295-368.

Granick S., 1959 – Magnesium Porphyrins formed by Barley seedling treated with δ-amino levulinic acid. *Plant Physiol.*, **34**, XVIII.

Heber U., 1962 – Protein synthesis in chloroplasts during photosynthesis. *Nature*, **195**, 91-92.

Heber U. et Tyskiewicz E., 1962 – The rate of photosynthesis in isolated chloroplasts. *J. exp. Botany*, **13**, 185-200.

Hodge A.J., Mc Lean J.D. et Mercer F.V., 1955 – Ultrastructure of the lamellae and grana in the chloroplasts of *Zea Mays* L. *J. biophys. biochem. Cytol.*, **1**, 605-613.

Hodge A.J., 1959 – Fine structure of lamellae systems as illustrated by chloroplasts. *Rev. mod. Phys.*, **31**, 331-341.

Hubert B., 1936 – The physical state of chlorophyll in the living plastid. *Rec. Trav. Bot. Néerl.* **32**, 323-387.

Karush F. et Sonenberg M., 1950 – Long-chain alkyl sulfates. *Anal Chemist*, **22**, 175-177.

Kranovsky A.A., Vorob'Eva L.M. et Pakashina E.V., 1957 – Investigation of the photochemically active form of chlorophyll in plants of different systematic groups. *Fiziol. Rast.*, **4**, 124-133.

Lefort M., 1963 – Etude comparative de certains mutants dépigmentés chez l'*Euglena Gracilis* et chez d'autres Algues. *C.R. Acad. Sci.*, **256**, 5 190-5 192.

Levine C. et Chargaff E., 1951 – Procedures for the microestimation of nitrogenous phosphatides constituents. *J. biol. Chem.*, **192**, 465-479.

Leyon H., 1954 – The development and structure of the *Aspidistra* chloroplast. *Exp. Cell. Res.*, **7**, 265-273.

Mac Kee H.S., 1950 – Studies on the nitrogen metabolism of the barley plant *(Hordeum sativum)*. *Austral. J. Sci. Res.* B **3**, 474.

Mac Kinney G., 1941 – Absorption of light by chlorophyll solutions. *J. biol. Chem.*, **140**, 315-322.

Mego J.L. et Jagendorf A.T., 1961 – Effect of light in growth of Black Valentine bean plastids. *Biochim. Biophys. Acta*, **53**, 237-254.

Miller E.C., 1938 – *Plant Physiology*, Mc Graw Hill Book Company, Inc., 242.

Moyse A., 1950 – *Respiration et métabolisme azoté. Etude de physiologie foliaire*. Hermann éd., Paris.

Ogur M. et Rosen G., 1950 – The nucleic acids of Plant tissues. I - The extraction and estimation of deoxypentose nucleic acid and pentose nucleic acid. *Arch. Biochem.*, **25**, 262-276.

Olivier H.R., 1961 – *Traité de Biologie appliquée*. Librairie Maloine, Paris, Société anonyme d'éditions médicales et scientifiques, **1**, 267.

OLSON R.A., BUTLER W.L. et JENNINGS W.H., 1961 – The orientation of chlorophyll molecules *in-vivo* : Evidence from polarized fluorescence. *Biochem. Biophys. Acta*, **54**, 615-617.

OLSON R.A., BUTLER W.L. et JENNINGS W.H., 1962 – The orientation of chlorophyll molecules *in-vivo* : further evidence from dichroism. *Biochim. Biophys. Acta*, **58**, 144-146.

PAECH K. et TRACEY M.V. 1955 – *Modern methods of plant analysis*. Springer-Verlag, Berlin, Vol. IV, 161.

PEARSALL W.H. et BILLIMORIA M.C., 1938 – Effects of age and of season upon protein synthesis in detached leaves. *Ann. Bot.*, **2**, 317-333.

PEARSALL W.H. et BILLIMORIA M.C., 1939 – The influence of light upon nitrogen metabolism in detached leaves. *Ann Bot.*, **3**, 601-618.

PUTNAM F.W. et NEURATH H., 1948 – The interactions of proteins and synthetic detergent. *Advances in Protein Chemistry.*, Acad. Press. New York, **4**, 79-122.

SAITO K. et AKASKI S., 1957 – Lipid material of *Bacillus alcaligenes faecalis*. I - Studies in the acetone insoluble fraction by paper electrophoresis. *J. Biochem.*, **44**, 511-524.

SAGER R. et PALADE G.E., 1957 – Structure and development of the chloroplast in *Chlamydomonas*. I. The normal green cell. *J. biophys. biochem. Cytol.*, **3**, 463-487.

SAUER K. et CALVIN M., 1962 – Molecular orientation in Quantasomes. I - Electric dichroism and electric birefringence of quantasomes from Spinach chloroplasts. *J. mol. Biol.*, **4**, 451-466.

SCHNEIDER W.C., 1945 – Phosphorus compounds in animal tissues. I - Extraction and estimation of desoxypentose nucleic acid and of pentose nucleic acid. *J. biol. Chem.*, **161**, 293-303.

SHIBATA K., 1957 – Spectroscopic studies on chlorophyll formation in intact leaves. *J. Biochem.*, **44**, 147-173.

SIGNOL M., 1961 *a* – Action de l'acide 3 – (α-iminoéthyl) – 5 méthyltétronique sur l'infrastructure des chloroplastes de Maïs. *C.R. Acad. Sci.*, **252**, 1 645-1 646.

SIGNOL M., 1961 *b* – Comparaison de l'action de la dihydrostreptomycine à celle de l'acide 3 – (α-iminoéthyl) – 5 méthyltétronique sur l'infrastructure des chloroplastes de *Zea Mays* L. *C.R. Acad. Sci.*, **252**, 1 993-1 995.

SMITH E.L., 1941*a* – The chlorophyll-protein compound of the green leaf. – *J. gen. Physiol.* **24** 565-582.

SMITH E.L., 1941*b*, – The action of sodium dodecyl sulfate on the chlorophyll-protein compound of the Spinach leaf. – *J. gen. Physiol.*, **24**, 583-596.

SMITH E.L. et PICKELS E.G., 1941 – The effect of detergents on the chlorophyll-protein compound of Spinach as studied in the ultracentrifuge. *J. gen. Physiol.*, **24**, 753-764.

STEIN W.H. et MOORE S., 1951 – Chromatography of amino-acids on sulfonated polystyrene resins. *J. biol. Chem.*, **192**, 663-681.

STEINMANN E. et SJÖSTRAND F.S., 1955 – The ultrastructure of chloroplasts. *Exp. Cell Research*, **8**, 15-23.

STEPHENSON M.L., THIMANN K.V. et ZAMECNICK P.C., 1956 – Incorporation of C^{14}-amino acids into proteins of leaf disks and cell-free fractions of Tobacco leaves. *Arch. Biochem. Biophys.*, **65**, 194-209.

SREENIVASAYA M. et PIRIE N.W., 1938 – The desintegration of Tobacco mosaic virus preparations with sodium dodecyl sulfate. *Biochem. J.*, **32**, 1 707-1 710.

THOMAS J.B., 1962 – Structure of the red absorption band of chlorophyll *a* in *Aspidistra Elatior*. *Biochim. Biophys. Acta*, **59**, 202-210.

THOMPSON J.F. et MORRISSON G.R., 1951 – Determination of organic nitrogen control of variables in the use of Nessler's reagent. *Anal Chem.*, **23**, 1 153-1 156.

VICKERY H.B., PUCHER G.W., WAKEMAN A.J. et LEAVENWORTH C.S., 1937 – Chemical investigations of the Tobacco plant. VI – Chemical changes that occur in leaves during culture in light and in darkness. *Connecticut Agr. Exp. St. Bull.*, **399**, 757-832.

VIRGIN H.L., 1961 – On the formation of protochlorophyll in normal green wheat leaves of varying ages. *Physiol. Plant.*, **14**, 384-392.

VIRGIN H.I., KAHN A. et VON WETTSTEIN D., 1963 – The physiology of Chlorophyll formation in relation to structural changes in chloroplasts. *Photochem. and Photobiol.*, Pergamon Press, **2**, 83-91.

Von Wettstein D., 1958 – The formation of plastid structures. *Brookhaven Symposia in Biology. The photosynthetical apparatus, its structure and function.* Brookhaven National Laboratory, 138-159.

Von Wettstein D., 1961 – Nuclear and cytoplasmic factors in development of chloroplasts structure and function. *Canad. J. Bot.*, **39**, 1 537-1 545.

Witt H.T., Müller A. et Rumberg B., 1962 – On the electron transfer in Photosynthesis. *Colloque international « La Photosynthèse ».* Centre National de la Recherche Scientifique. éd., Paris 1963, 43-73.

Wolken J.J., 1958 – The chloroplast structure, pigments and pigment-protein complex. *Brookhaven Symposia in Biology. The photosynthetical apparatus, its structure and function.* Brookhaven National Laboratory, 87-99.

Yemm E.W., 1937 – Respiration of Barley plants. III – Protein catabolism in starving leaves. *Proc. r. Soc.* (London) B **123**, 243-273.

Table des Matières

Pages

RÉSUMÉ 363
SUMMARY 363
INTRODUCTION 364
ACTION DES DÉTERGENTS SUR LES CHLOROPLASTES 366
Action du dodécylsulfate de sodium 366
Matériel et méthodes 366
Séparation des chloroplastes et extraction du complexe pigmenté 366
Précipitation fractionnée du complexe 367
Electrophorèse sur papier 367
Techniques d'analyse 367
Extraction et analyse des phospholipides 367
Traitement de l'insoluble à l'éther alcool 369
Techniques relatives aux substances radioactives 370
Révélation des taches radioactives sur les bandes d'électrophorèse ou sur les chromatogrammes 370
Mesure de la radioactivité des substances 370
Résultats 370
Précipitation par le sulfate d'ammonium 371
Electrophorèse sur papier 371
Analyse biochimique de l'extrait total et des fractions précipitées par le sulfate d'ammonium 373
Analyse des phospholipides des différentes fractions 374
Analyse des nucléotides et des acides nucléiques 378
Action du Tween 20 379
Traitement des chloroplastes par le Tween 20 379
Chromatographie de l'extrait au Tween 20, *sur DEAE cellulose* 380
Electrophorèse de l'extrait au Tween 20, *sur gélose* 381
Discussion 382
FORMATION DES CHLOROPLASTES AU COURS DU VERDISSEMENT DES PLANTULES ÉTIOLÉES 383
Matériel et techniques 384
Obtention et analyse des plastes 384
Expression des résultats 385
Résultats 386
Répartition des plastes au cours des centrifugations 386
Répartition de l'azote protéique dans les limbes de plantes vertes et de plantes étiolées 386
Métabolisme de l'*N chromoprotéique* des plastes pendant le verdissement 388
Incorporation du ^{35}S dans les substances organiques pendant le verdissement 388
Incorporation des acides aminés marqués pendant le verdissement 389
cystéine ^{35}S 389
glycocolle 2 ^{14}C 390
acide δ-amino-lévulique 391
Zone de protéosynthèse intense et de formation des plastes 394
Croissance des plastes 396
Comparaison des compositions en acides aminés des protéines holochromes des chloroplastes et des proplastes 397
Incorporation de la lysine ^{14}C pendant le verdissement 398
Incorporation des acides aminés dans les protéines des plastes isolés 399
Action des inhibiteurs de la protéogenèse 400
Etude de quelques propriétés des protéines synthétisées par les proplastes 401
solubilité 401
propriétés électrophorétiques 401
— extraction des protéines par le SDS 401
— extraction des protéines par l'acide formique 401
Analyse des acides nucléiques des chloroplastes et des proplastes 402
Discussion 403
CONCLUSIONS 404
BIBLIOGRAPHIE 405

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

MORPHOLOGIE ET COMPOSITION DE L'UNITÉ PHOTOSYNTHÉTIQUE

Vu et approuvé
Paris, le 20 DEC. 1964
Le Doyen de la Faculté des Sciences
Marc ZAMANSKY

Vu et permis d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie de Paris
Jean ROCHE

IMPRIMÉ EN FRANCE
IMP. MARCEL BON - VESOUL
DÉPOT LÉGAL : IMP. 997-I-65
——— ÉDITEUR 1297 ———